

**SARA CARVALHO E SILVA REIS**



**Eficácia de uma Vacina de Rebanho numa Vacada com Doença Granulomatosa Ulcerativa por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Actinomyces bovis*: Estudo de Caso**

**Orientador:** Professor Doutor João Cannas da Silva

**Coorientadora:** Mestre Maria do Carmo Feliciano

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias  
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2017

**SARA CARVALHO E SILVA REIS**



**Eficácia de uma Vacina de Rebanho numa Vacada com Doença Granulomatosa Ulcerativa por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Actinomyces bovis*: Estudo de Caso**

Dissertação defendida me provas publicas para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, no dia 24 de Abril de 2017, com o Despacho Reitoral nº 123/2017, com a seguinte composição de Júri:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Sofia van Harten

Orientador: Professor Doutor João Cannas da Silva

Vogal: Professora Doutora Ana Araújo Munhoz

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**  
**Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2017

## **Dedicatória**

Dedico a presente dissertação de mestrado à minha família e, em especial, à minha Mãe. À minha Mãe, porque sem ela nada teria sido possível. À minha família por me terem apoiado e ajudado ao longo de toda a minha vida.

## **Agradecimentos**

O meu muito obrigado ao Dr. Luís Fragoso, por todos os conhecimentos transmitidos ao longo do tempo de estágio, tendo sido um privilégio acompanhá-lo. Pela amizade, disponibilidade, simpatia com que sempre me recebeu. Por todo o apoio, incentivo e por me ter proporcionado um estágio tão enriquecedor. À restante equipa da Luso-Pecus, por me terem recebido tão bem, em especial à Dr.<sup>a</sup> Helena Lolanda pela paciência e ensinamentos durante o estágio. Agradeço igualmente à equipa do ADS do Baixo Tejo e em especial ao Paulo por toda a simpatia, companheirismo e por tudo o que aprendi com ele.

Um obrigado também a todos os produtores que me receberam sempre de boa vontade, abrindo as portas das suas explorações.

Ao Professor Doutor João Cannas da Silva por toda a ajuda fundamental na elaboração deste estudo.

À Professora Dr.<sup>a</sup> Maria do Carmo Feliciano um obrigado pela atenção que me disponibilizou e conselhos que me deu.

A todos os Professores da FMV-ULHT, por todos os ensinamentos.

À equipa do laboratório sorológico, pela rapidez e eficiência com que trataram do que lhes solicitei.

A todos os meus colegas e amigos da ULHT, pela partilha e amizade oferecidos durante todo o meu percurso académico, em especial à Ana Lemos e Rita Castro pelas grandes amigas em que se tornaram desde o primeiro dia em que as conheci até hoje.

À Susana Bretes pela amizade e pela ajuda que me deu na formatação desta dissertação.

Agradeço à minha Família, em especial aos meus pais e irmão, pilares fundamentais durante todo o meu percurso académico. Agradeço-lhes por me terem proporcionado desde sempre uma educação exemplar e por todos os seus esforços e sacrifícios para que tal fosse possível.

À minha Mãe, um obrigada especial por me proporcionar a realização de um sonho.

Agradeço ao meu marido e filhos, pois eles são a razão para tudo fazer sentido.

Agradeço a todos os que colaboraram de forma direta ou indireta na realização deste estudo, pois sem eles a realização do mesmo não teria sido possível. Bem-hajam todos.

## Resumo

O presente trabalho descreve a identificação e isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Actinomyces bovis* numa vacada naturalmente infetada na região do Ribatejo. Ao exame físico dos animais afetados observaram-se abscessos piogranulomatosos com localização mandibular e retrofaríngea, sem outros sinais clínicos. Realizou-se a punção do local das lesões e enviou-se a amostra para o laboratório, onde os agentes foram isolados e identificados. Para prevenção de novos surtos e tratamento dos animais afetados, tendo em consideração que se trata de uma patologia infecciosa para a qual não existem vacinas comerciais disponíveis, optou-se pela realização de uma vacina de rebanho polivalente, efetuada com os agentes isolados da amostra enviada, *Actinomyces bovis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Aplicou-se a mesma e avaliou-se a eventual ocorrência de reações vacinais locais, as quais não foram significativas. Um ano após a aplicação da vacina, fez-se uma avaliação da sua eficácia e, consoante os resultados obtidos, concluiu-se que foi benéfica a sua utilização, uma vez que houve uma diminuição na taxa de prevalência.

Palavras-Chave: *Actinomyces bovis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Bovino, Vacina de Rebanho, Vacina Autógena

## Abstract

The present work describes the identification and isolation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Actinomyces bovis* in a naturally infected herd in the region of Ribatejo. By the physical examination of the infected animals, pyogranulomatous abscesses were observed in the mandibular and retropharyngeal area, with no other clinical signs. A local puncture was done at the wounded area, after with a sample was sent to the lab, where all agents were isolated and identified. To prevent further surges and treatments, taking in consideration that this is an infectious pathology for which there are no commercial vaccines available, the choice fell upon multipurpose herd vaccination, prepared from the sample of the isolated agents previously sent, *Actinomyces bovis* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. The vaccine was applied and eventual reactions to it were evaluated, which were deemed irrelevant. One year after the vaccine application, its effectiveness was evaluated, having the results proved its benefits, since there was a decrease in the prevalence rate.

Keywords: *Actinomyces bovis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Bovine, Herd Vaccine, Autogenous Vaccine

## Abreviaturas, Siglas e Símbolos

% - Por cento (percentagem)

µm – Micrómetro

bpm – Batimentos cardíacos por minuto

mrn – Movimentos respiratórios por minuto

DNA – Ácido desoxirribonucleico/Desoxirribonucleic Acid

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

I – Incidência

L – Letalidade

P – Prevalência

°C – Grau Celsius

PAAF – Punção Aspirativa com Agulha Fina

CAAF – Citologia Aspirativa com Agulha fina

PCR – Polymerase Chain Reaction

Ph – Potência de Hidrogénio

*C. pseudotuberculosis* – *Corinebacterium pseudotuberculosis*

*A. bovis* – *Actinomyces bovis*

16G – 16 gauge

H<sub>2</sub> – Hidrogénio

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

TO – Trabéculas Ósseas

HE – Hematoxilina Eosina

Obj.- Objetiva

# Índice

Dedicatória.....	3
Agradecimentos .....	4
Resumo .....	5
Abstract.....	6
Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	7
Índice .....	8
Índice de Tabelas .....	10
Índice de Gráficos.....	10
Índice de Figuras .....	10
1. Introdução.....	12
2. Revisão Bibliográfica.....	14
2.1. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	14
2.1.1. Nota Histórica .....	14
2.1.2. Classificação e descrição do Agente .....	14
2.1.3. Epidemiologia .....	17
2.1.4. Transmissão.....	18
2.1.5. Patogenicidade .....	19
2.1.6. Manifestações Clínicas.....	20
2.1.7. Diagnóstico.....	23
2.1.8. Achados microscópicos das Lesões .....	24
2.1.9. Achados Necroscópicos .....	25
2.1.10. Tratamento .....	25
2.1.11. Controlo da doença e medidas profiláticas .....	26
2.1.12. Profilaxia através da vacinação .....	26
2.1.13. Implicações na saúde pública.....	27
2.2. <i>Actinomyces bovis</i> .....	28
2.2.1. Nota Histórica .....	28
2.2.2. Classificação e descrição do Agente .....	28
2.2.3. Epidemiologia .....	29
2.2.4. Transmissão.....	30
2.2.5. Patogenicidade .....	30



2.2.6. Manifestações Clínicas.....	31
2.2.7. Diagnóstico.....	32
2.2.8. Morfologia Colonial e Aparência Microscópica.....	33
2.2.9. Achados Necroscópicos .....	35
2.2.10. Tratamento .....	35
2.2.11. Controlo da doença e medidas profiláticas .....	36
2.2.12. Implicações na saúde pública.....	36
2.3. Vacinas autógenas.....	36
2.3.1. História das vacinas autógenas.....	36
2.3.2. Vacinas autógenas de uso veterinário, autovacinas e vacinas de rebanho .....	37
2.3.3. Recolha de amostras para formulação de vacinas de rebanho .....	39
2.3.4. Processo de Produção das vacinas autógenas bacterianas inativadas de uso veterinário.....	39
2.3.5. Reações adversas da vacinação .....	42
2.3.6. Vantagens na utilização de vacinas autógenas de rebanho .....	43
2.3.7. Desvantagens na utilização de vacinas autógenas de rebanho .....	45
3. Objetivos .....	46
4. Material e Métodos.....	47
4.1. Caracterização da exploração .....	47
4.1.1. Maneio Alimentar .....	48
4.1.2. Maneio Reprodutivo.....	48
4.1.3. Maneio Sanitário .....	48
4.2. Metodologia .....	49
4.3. Recolha de Dados .....	49
4.4. Sinais Clínicos .....	49
4.5. Colheita de amostras .....	52
4.6. Tratamento Instituído.....	53
4.7. Cálculo da Taxa de prevalência antes da Vacinação .....	54
4.8. Cálculo da Letalidade: .....	54
5. Resultados .....	55
5.1. Diagnóstico .....	55
5.2. Taxa de Prevalência da doença antes da vacinação .....	55
5.3. Taxa de Letalidade da Doença.....	55

5.4. Taxa de Prevalência da Doença 1 ano após a Vacinação .....	56
5.5. Taxa de Incidência da doença um ano após a vacinação .....	56
5.6. Cálculo da Morbidade .....	57
5.7. Reações vacinais .....	57
5.8. Profilaxia e Controlo.....	58
6. Discussão.....	59
7. Conclusão.....	61
Bibliografia.....	62
Anexos.....	I
Anexo I – Resultados da primeira análise microbiológica solicitada, para pesquisa de <i>Actinobacillus lignieresii</i> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Anexo II – Resultados do teste de sensibilidade aos antibióticos referentes à amostra enviada.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Anexo III – Resultados da segunda análise microbiológica solicitada, para nova pesquisa do agente etiológico .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Bactérias <i>Corynebacterium</i> spp que infetam animais e têm um papel ativo na produção de doenças. (Adaptado de Gyles et al., 2010).....	17
Tabela 2- Indicadores do estado geral dos animais com sinais clínicos.....	51
Tabela 3 – Indicadores do estado geral dos animais com sinais clínicos .....	51

## Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Taxa de Prevalência da Doença antes da Vacinação. A taxa de prev .....	55
Gráfico 2 - Taxa de Prevalência da Doença um ano após vacinação .....	56

## Índice de Figuras

Figura 1 - Actinomicose em bovino: Osteomielite piogranulomatosa. Piogranuloma com bacilos filamentosos no centro no meio de trabéculas osseas. HE. Obj. 20x (Adaptado de Tessele et al., 2014). .....	34
--	----

Figura 2 - Aspeto histológico da actinomicose bovino. Aglomerado de Bacilos filamentosos. MacCallum-Goodpasture. obj 100x (imersão) (Adaptado de Tessele et al., 2014). ....	34
Figura 3 - Classificação simplificada dos principais efeitos adversos da vacinação (Tizard, 2014, p. 278).....	43
Figura 4 - Localização geográfica do concelho da Azambuja, em Portugal continental .....	47
Figura 5 - Localização da exploração, Mouchão do Salgueiral, no concelho de Azambuja....	47
Figura 6 - Fêmea A com abscesso na zona retrofaringea, após lancetagem. (foto do autor).....	50
Figura 7 - Fêmea A com abscesso na zona retrofaringea, após lancetagem. (foto do autor).....	50
Figura 8 - Abscesso já fistulado do Macho. (foto do autor).....	50
Figura 9 - Macho com abscesso na zona sub-mandibular. (foto do autor) .....	50
Figura 10 - Fêmea B com abscesso fistulado na zona retrofaríngea, já cicatrizado (foto do autor).....	50
Figura 11 - Amostra recolhida do abscesso (foto ao autor) .....	53
Figura 12 - Amostra recolhida do abscesso (foto ao autor) .....	53

## 1. Introdução

O controlo das doenças infecciosas tem uma enorme importância económica na indústria animal. Os agentes infecciosos podem devastar a saúde de uma vacada inteira. O controlo e tratamento apropriado fazem parte integral na produção animal. Vários métodos são utilizados no controlo destes agentes, nomeadamente: bom manejo, incluindo o espeto higieno-sanitário, e a implementação de medidas de biossegurança nas explorações pecuárias, utilização de antibióticos no caso de infeções bacterianas, rastreio, vacinação e abate dos animais afetados (Bowersock, 2002).

*Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente causador da linfadenite caseosa é um bacilo Gram-positivo, curto e pleomórfico, pertencente ao grupo dos Actinomyces, (Camargo *et al.*, 2010). As infeções causadas por este agente em várias espécies de animais de produção são caracterizadas por processos piogranulomatosos crónicos (Motta *et al.*, 2010). Segundo Gomes (2015), nos bovinos, o *C. pseudotuberculosis* tem muitas apresentações clínicas.

O potencial deste agente para sobreviver várias semanas no ambiente, contribui para a sua disseminação entre os animais, característica essa que provoca perdas económicas advindas da diminuição progressiva do ganho de peso e, eventualmente, morte causada por toxemia (Camargo *et al.*, 2010).

O diagnóstico é efetuado através do cultivo do microrganismo, a partir do conteúdo dos abscessos obtidos por punção aspirativa ou extirpação cirúrgica (Motta *et al.*, 2010).

No que diz respeito ao tratamento, a viabilidade intracelular do microrganismo, limita a ação dos antibióticos convencionais, o que explica os insucessos terapêuticos que são creditados geralmente à dificuldade de obtenção dos níveis terapêuticos nos locais de infeção. No entanto, muitas vezes os antibióticos escolhidos são oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, sulfonamidas-trimetoprim, penicilina e rifampicina. Em animais de grande valor zootécnico, a extração cirúrgica dos abscessos e/ou linfonodos externos é sugerida como parte do tratamento (Motta *et al.*, 2010).

A actinomicose é uma enfermidade crónica infetocontagiosa causada pela bactéria *Actinomyces bovis*, que acomete principalmente os ruminantes e pode ser transmitida aos humanos. É caracterizada pela presença de lesões granulomatosas e supurativas, localizadas na maxila ou na mandíbula. O diagnóstico baseia-se na biopsia e cultivo, contudo, na maioria das vezes é realizado pelo aspeto clínico da lesão. O tratamento apoia-se na remoção cirúrgica da lesão, associada à administração de iodeto de sódio e antibioterapia (Sturion *et al.*, 2015).

Para o controlo das doenças infetocontagiosas que afetam os animais, a vacinação é, atualmente, uma das estratégias mais eficazes. A ausência de disponibilidade no mercado de vacinas indicadas para a prevenção de diversas doenças de etiologia bacteriana com grande impacto na saúde animal e/ou no rendimento zootécnico das espécies pecuárias tem conduzido ao recurso à utilização de vacinas autógenas (Carvalho, 2007).

A ideia de realizar um estudo sobre este tema surgiu após a observação de várias explorações com sinais clínicos idênticos, sugestivos desta afeção durante o estágio, e em nenhuma das quais teria sido instituído tratamento.

Na realidade agropecuária de Portugal, a abordagem técnica e científica à bovinicultura de carne é ainda escassa, sendo pouco usual a adesão dos produtores a práticas que ultrapassem o mínimo sanitário imposto por lei, e havendo poucas publicações científicas nacionais a esse respeito.

Por coincidência, surgiram animais com sinais clínicos idênticos na vacada de um familiar, e assim, a hipótese de estudo e tratamento da afeção.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

#### 2.1.1. Nota Histórica

Em 1888, Edmond Nocard descreveu, pela primeira vez, bactérias pleomórficas num caso de linfangite bovina. O búlgaro Hugo Von Preïsz, em 1891, identificou bactérias semelhantes numa cultura de um abscesso renal de ovelha. Como consequência destes relatos, o microrganismo foi denominado, originalmente, como Bacilo de Preïsz-Nocard. Na Alemanha, em 1896, Lehmann e Neumann, renomearam a bactéria como *Bacillus pseudotuberculosis*, do grego “*pseudes tuberculosis*”, que significa “tubérculos falsos”, em virtude da semelhança com os abscessos caseosos comumente encontrados na tuberculose (Motta *et al.*, 2010).

Eberson, em 1918, sugeriu nova classificação como *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Em 1923, com a edição do Manual Bergey, muitas das discrepâncias ficaram solucionadas, e o microrganismo foi agrupado no género *Corynebacterium*, recebendo a nova denominação de *Corynebacterium ovis*. Em 1948, com a saída da 6.<sup>a</sup> edição do Manual Bergey, foi-lhe atribuída a nomenclatura oficial de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que se mantém até à atualidade (Ruiz *et al.*, 2007).

#### 2.1.2. Classificação e descrição do Agente

A espécie *Corynebacterium* pertence à família *Corynebacteriaceae* da ordem *Actinomycetales*. *Corynebacterium* pertence aos actinomicetos aeróbicos, que também contemplam outros microrganismos patogénicos para animais incluindo: *Nocardia sp*, *Rhodococcus equi*, *Mycobacterium sp* e *Arcanobacterium pyogenes*, visto que partilham certas características da parede celular, incluindo a espessura, a presença de ácidos micólicos, e os ácidos gordos saturados e insaturados. *Corynebacterium pseudotuberculosis* caracterizam-se como organismos em forma de cocobacilos, Gram positivos, plemórficos, imóveis, desprovidos de esporos, medindo entre 0,5-0,8 µm por 1,0-3,0 µm, isolados ou em grupos irregulares, em paliçadas, decorrentes da grande quantidade de lípidos na sua parede celular, particularmente o ácido corinomicólico. São microaerófilos (5% de gás carbónico), mas toleram condições de aerofilia em meios de cultura. São microrganismos intracelulares e anaeróbios facultativos e multiplicam-se facilmente em temperaturas de cerca de 37° C e pH 7,0 a 7,2 (Dorella *et al.* (2006), Motta *et al.* (2010) e Markey *et al.* (2013).

A classificação fenotípica de *C. pseudotuberculosis*, segundo Motta *et al.* (2010), é fundamentada nas características de cultivo microbiano e em provas bioquímicas. Os microrganismos são cataláse e ureáse positivos, fermentam carboidratos sem a produção de gás (maltose, manose, glicose) e não fermentam a lactose. Estes não possuem atividade proteolítica, sendo portanto incapazes de hidrolisar a gelatina ou digerir a caseína. No meio de ágar sangue ovino ou bovino, *C. pseudotuberculosis* é isolado, caracteristicamente, a partir de 48 horas de incubação, apresentando colônias brancas ou opacas, rodeadas por um halo de beta-hemólise. Após 72 horas de incubação, as colônias podem atingir 2 a 3 mm de diâmetro e assumem coloração creme-amarelada.

*C. pseudotuberculosis* possui dois biótipos denominados *ovis* e *equi*, que são definidos pela sua capacidade de produzir a enzima nitrato-redutase, que permite a conversão do nitrato para nitrito em provas bioquímicas. O biótipo *equi* possui capacidade de reduzir o nitrato a nitrito, enquanto que o biótipo *ovis* não reduz este substrato. O biótipo *equi* infeta, preferencialmente, os equinos, enquanto que o biótipo *ovis* acomete os pequenos ruminantes. Os bovinos podem ser infectados pelos dois biótipos, com predomínio do biótipo *equi*. A classificação dos biótipos de *C. pseudotuberculosis*, especialmente usando PCR e enzimas de restrição, tem retificado a classificação com base bioquímica pela redução ou não do nitrato (Motta *et al.*, 2010).

A bactéria contém lípidos na parede ou ácidos corinomicólicos, à semelhança dos ácidos micólicos presentes nos gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Mycobacterium*. Ao contrário do que é característica nas micobactérias não apresenta álcool-ácido resistência. A fração lipídica da parede dificulta o processo de fagocitose, pois impede a hidrólise enzimática dos lisossomas e potencia os efeitos citotóxicos no hospedeiro estando diretamente relacionada com a característica piogénica da afeção, reconhecida como fator determinante na virulência do microrganismo. A composição da parede celular dos actinomicetos confere a este grupo de patógenos a capacidade de resistência ambiental por longos períodos, mesmo sob condições adversas de exposição à luz solar direta ou dessecação. *C. pseudotuberculosis* mantém-se viável 55 dias em objetos inanimados contaminados por pus, ou até 8 meses em constante variação das condições de temperatura e humidade (Motta *et al.*, 2010).

A enzima *Fosfolipase D*, encontrada nas linhagens de *C. pseudotuberculosis* possui ação de exotoxina glicoproteica ou citotoxina capaz de hidrolisar a esfingomielina, enfraquecendo as membranas celulares e favorecendo a infecção pelo microrganismo. O efeito hemolítico da *Fosfolipase D* de *C. pseudotuberculosis* possui sinergia com a *Fosfolipase C* de

*Rhodococcus equi*, possibilitando a confirmação diagnóstica destes microrganismos (Motta *et al.*, 2010).

Aparentemente, *C. pseudotuberculosis* não sintetiza outra citolisina com efeito hemolítico, sendo que Baird e Fontaine (s/d, citado por Motta *et al.*, 2010) descreveram que a *Fosfolipase D* também atua sobre o endotélio vascular, aumentando a permeabilidade e contribuindo para a disseminação do agente patogénico no local da infecção primária para os linfonodos, determinando necrose dérmica, agregação plaquetária e, em casos graves, falência renal.

Segundo Gyles *et al.* (2010), outras espécies, incluindo *Corynebacterium aquilae*, *Corynebacterium capitis*, *Corynebacterium caspium*, *Corynebacterium ciconiae*, *Corynebacterium falsenii*, *Corynebacterium felinum*, *Corynebacterium phocae*, *Corynebacterium sphenisci*, *Corynebacterium spheniscorum*, e *Corynebacterium testudinoris*, têm sido isoladas em animais, mas sem nenhuma ligação a doenças.

As bactérias *Corynebacterium spp* que infetam animais e que têm um papel ativo na produção de doenças encontram-se enunciadas na tabela 1.

<b>Corynebacterium spp</b>	<b>Principal hospedeiro</b>	<b>Doença</b>	<b>Outros hospedeiros</b>	<b>Doenças</b>
<i>C. amycolatum</i>	Homem	Bacteriemia, endocardites, artrite séptica	Bovinos	Mastites
<i>C. auriscanis</i>	Cão	Otites externas	Homem	
<i>C. bovis</i>	Bovinos	Mastites	Homem, coelho	Abcessos, hiperqueratose, dermatites
<i>C. camporealis</i>	Ovinos	Mastites	-----	-----
<i>C. cystitidis</i>	Bovinos	Cistites, pielonefrites	-----	-----
<i>C. felinum</i>	Felinos		-----	-----
<i>C. glucuronolyticum</i>	Homem, suíno	Infeções geniturinárias	-----	-----
<i>C. jeikeium</i>	Homem	Endocardites, bacteriemia, septicemia	Gato	Infeções do Sistema urinário
<i>C. kutscheri</i>	Roedores de laboratório	Abcessos, pneumonia, pseudotubercul	Homem	Arterite séptica



		ose		
<i>C. mastididitis</i>	Ovinos	Mastites	-----	-----
<i>C. matruchotii</i>	Equinos	Cistites	-----	-----
<i>C. minutissimum</i>	Homem	Infeções cutâneas	Bovinos	Mastites
<i>C. pilosum</i>	Bovinos	Cistites, pielonefrite	Homem, equinos	Endocardites
<i>C. pseudotuberculosis</i>	Ovinos, Caprinos, equinos	Linfadenite caseosa, pericardites, pleurite, celulite	Homem, alpaca, bovinos, camelos, suínos, cervo	Linfadenites, abscessos, mastites
<i>C. renale</i>	Bovinos	Cistites, pielonefrites	Ovinos, caprinos, cervos, roedores de laboratório	Cistites, Pielonefrites, osteomielites
<i>C. suicordis</i>	Suínos	Pericardites	-----	-----
<i>C. ulcerans</i>	Homem	Faringites, sinusites, infeções cutâneas	Primatas, camelos, Gatos, bovinos	Infeções respiratórias, linfadenite caseosa, mastites
<i>C. urealyticum</i>	Homem	Cistites, pielonefrites	Cão, gato	-----
<i>C. xerosis</i>	Suínos	Arterites, abscessos	Caprinos	Paratuberculose

Tabela 1 - Bactérias *Corynebacterium spp* que infetam animais e têm um papel ativo na produção de doenças. (Adaptado de Gyles *et al.*, 2010)

### 2.1.3. Epidemiologia

*Corynebacterium pseudotuberculosis* são bactérias cosmopolitas de distribuição mundial que se encontram predominantemente no solo, na pele e nas mucosas dos animais (Motta *et al.*, 2010).

A linfadenite caseosa causada pelo agente é uma das doenças infecciosas com prevalência mais elevada em países com tradição na criação de ovinos e caprinos (Belchior *et al.*, 2006). Conforme refere Radostits *et al.* (2002), esta ocorre na África do Sul, no Médio Oriente, na América do Norte e do Sul, na Inglaterra e na maior parte das regiões do norte e sul da Europa.

A infeção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma das doenças mais comuns encontradas nos bovinos em Israel (Yeruham *et al.*, 2003).

A incidência da doença, segundo Cheuquepan *et al.*, (2008), tem aumentado nos países endêmicos e aparecido noutros onde a enfermidade era considerada exótica, como no Reino Unido. A sua ocorrência tem sido associada a maneios específicos, quando os animais se alimentam de forragens secas, pelo que as estações de verão tendem a ser épocas de maior risco.

Apesar de existirem casos relatados em todo o mundo, são as regiões centro e sul do estado da Califórnia as que apresentam maior número de casos (Rocha Balbino, 2011).

#### **2.1.4. Transmissão**

O potencial do *C. pseudotuberculosis* sobreviver por várias semanas no ambiente, contribui para a sua capacidade de propagação dentro de um rebanho (Dorella *et al.*, 2006).

Em bovinos, a infeção por *C. pseudotuberculosis* é normalmente, segundo Motta *et al.* (2010), associada a mau manejo higiénico das explorações, uma vez que é mais frequente quando existem animais com lesões cutâneas em ambientes muito húmidos. Também se coloca a hipótese da participação de insetos hematófagos na sua transmissão, lesionando mecanicamente a derme, podendo estes contribuir para a incidência sazonal da doença.

O microrganismo pode penetrar, através da mucosa bucal ou por inalação, desenvolvendo abscessos pulmonares. O agente adota uma atitude de parasita intracelular facultativo, após a inoculação no hospedeiro (Gomes, 2015).

A contaminação entre ovinos ou caprinos ocorre, especialmente, pela contaminação de superfícies, que podem ocorrer durante procedimentos comuns, como as tosquiadas, as castrações, as marcações auriculares ou outras lesões físicas geradas por outras causas. A contaminação de feridas, com secreções de animais infetados, é também comum (Dorella *et al.*, 2006).

Segundo um estudo realizado por Yeruham *et al.* (2003), numa exploração de bovinos em Israel, a infeção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, pode ser transmitida entre rebanhos através da introdução de animais infetados em explorações livres de doença. Dentro de cada rebanho, a infeção pode espalhar-se através do contacto direto entre os animais ou por transmissão mecânica através de insetos. O potencial para a contaminação do meio ambiente a partir de um único abcesso ulcerado é muito elevado, e a capacidade do microrganismo sobreviver no solo e em fomites, assegura a sua presença. O gotejamento da glândula mamária de um animal infetado também pode contaminar o ambiente e infetar animais sãos. Como resultado da infeção primária de um animal, as bactérias podem tornar-se

disseminadas. Parece que as condições climáticas e geográficas fazem variar a incidência da doença sazonalmente, e a idade e a raça dos animais são também potenciais fatores para a ocorrência da doença.

A fonte natural da infecção e os meios de entrada no hospedeiro não se encontram bem documentados em bovinos (Sood *et al.*, 2012).

Nos equinos, os vetores como a mosca doméstica, *Stomoxys calcitrans* e *Culicoides* apresentam uma grande importância epidemiológica na disseminação do microrganismo (Motta *et al.*, 2010).

### **2.1.5. Patogenicidade**

As infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* são caracterizadas por processos piogranulomatosos crônicos em algumas espécies de animais de produção como os ovinos e caprinos (Sood *et al.*, 2012).

A espécie e higidez dos animais, os biótipos do microrganismo, a capacidade de manutenção no interior de fagócitos, o estabelecimento de lesões piogranulomatosas, aliadas à ação da enzima *Fosfolipase D* e a resistência aos antibióticos convencionais, provavelmente determinam a patogenicidade do microrganismo e o estabelecimento das infecções nos animais (Motta *et al.*, 2010).

A linfadenite caseosa é uma doença crônica e contagiosa de ovinos e caprinos, ocorrendo ocasionalmente em bovinos, equinos e suínos (Sood *et al.*, 2012).

Muitos fatores contribuem para a sobrevivência e formação de abscessos. A *Fosfolipase D* aumenta a permeabilidade vascular, um fator piogénico estável que atrai leucócitos e a presença de lípidos na superfície que são tóxicos para os leucócitos. A alta quantidade de lípidos na parede celular, também faz parte dos fatores implicados na patogenicidade e virulência do *C. pseudotuberculosis*. Estes permitem que o agente sobreviva ileso dentro das células fagocíticas do hospedeiro, produzindo abscessos nos linfonodos regionais ou que são levados pelos vasos linfáticos para outros órgãos internos. A doença é uma infecção cutânea que se inicia com inflamação local, atingindo lentamente os linfonodos regionais e formação de abscessos (Sood *et al.*, 2012; Gomes, 2015).

### 2.1.6. Manifestações Clínicas

#### 2.1.6.1. Bovinos

A infecção é raramente observada em bovinos, no entanto foi descrita pela primeira vez, em 1888, num caso de linfangite. Mais tarde, foi descrito que o *C. pseudotuberculosis* causa mastites, quer naturalmente, quer experimentalmente (Sood *et al.*, 2012).

Segundo Gomes (2015), nos bovinos, o *C. pseudotuberculosis* tem muitas apresentações clínicas, incluindo abscessos subcutâneos; linfangite ulcerativa; infeções viscerais acompanhadas, ou não, de abscessos subcutâneos; abscessos subcutâneos acompanhados, ou não, de mastites; ou mastite isolada. Na mastite isolada, geralmente está associado ao “*Biovar Equi*”, enquanto que nos demais casos está associado ao “*Biovar Ovis*”. Os abscessos subcutâneos possuem um tamanho entre 15 a 20 cm de diâmetro (variação entre 1 e 50 cm) e localizam-se, geralmente, na cabeça, pescoço, ombros, flancos e membros. Os abscessos possuem consistência dura e fistulam, deixando verter um exsudato sanguinolento ou purulento amarelado com estrias de sangue que evolui para a formação de lesões ulcerosas. Os linfonodos da região atingida aumentam de volume (adenomegalia), mas não mostram lesões específicas. As formas viscerais são raras e caracterizadas pela presença de abscessos nas vias respiratórias e nos linfonodos internos. As mastites podem ser subclínicas ou clínicas. Nas formas graves, o úbere é o local de inflamação e a secreção láctea pode adquirir um aspeto purulento, mas o estado geral dos animais não é necessariamente alterado.

O *Corynebacterium pseudotuberculosis* provoca linfadenite ulcerativa, especialmente devido a escoriações na parte distal dos membros. É uma doença moderadamente contagiosa, especialmente de equinos mas também registada em bovinos. A infecção das feridas da pele é seguida pela invasão dos vasos linfáticos e do desenvolvimento de abscessos no seu trajeto. No entanto, normalmente os outros linfonodos não são afetados (Radostits *et al.*, 2002).

Conforme referem Pereira *et al.*, (2010), as lesões primárias em bovinos consistem em nódulos subcutâneos múltiplos na região metacarpiana ou metatarsal. Os nódulos ulceram periodicamente e drenam uma secreção mucopurulenta que varia de serosa a caseosa. Inicialmente, antes da ulceração, os animais podem apresentar claudicação moderada, que melhora à medida que a drenagem ocorre. Com o decorrer do tempo, os nódulos podem coalescer ou formar cordões teciduais emaranhados, especialmente subcutâneos. Não se verifica a presença de outros sinais para além de claudicação e ulceração suave periódica.

Yeruham *et al.* (2003) num estudo, com duração de 13 anos, reportaram a identificação de *C. pseudotuberculosis* em 827 animais de 45 exploração em Israel, onde a condição se manifestou na forma cutânea em mastites e na forma visceral. Na forma de mastite que se verificou em 59 animais, o autor refere uma descida na produção de leite e um aumento das células somáticas. A forma cutânea da doença ocorreu em 91,3% dos animais infetados, a forma cutânea juntamente com a forma mastítica em 7,1% dos animais e a forma cutânea aliada á forma visceral ocorreu, apenas, em 1,6% das 125 vacas infetadas e que foram submetidas a exame *post-mortem*. Não foram observadas formas mastíticas sem forma cutânea associada. Os linfonodos regionais estiveram envolvidos em todos os casos, mas a linfadenite generalizada e a linfangite não foram observadas. Na maioria dos casos não foram observados sinais de doença sistémica nos animais infetados.

No seu estudo, Yeruham *et al.*, (2003), refere também a presença de dermatite necrótica e ulcerativa no casco de novilhas de duas das explorações estudadas, nos meses de inverno, com taxas de morbilidade de cerca de 76,2%. A maioria das estirpes de *C. pseudotuberculosis* que foram isoladas dos abcessos e das amostras de leite foram nitrato-redutase negativo. A maioria dos casos (84,4%) ocorreu durante os meses secos do ano, entre março a outubro. Em 38 das manadas estudadas, a infeção durou cerca de 5 meses. Os animais mais novos foram os mais suscetíveis.

*C. pseudotuberculosis*, forma visceral da doença, foi descrito por Sood *et al.* (2012), num vitelo na Índia, em que pela primeira vez apenas os linfonodos mesentéricos se apresentavam infetados isoladamente. Segundo o autor, há uma escassez de literatura sobre linfadenite caseosa em bovinos em todo o mundo.

#### 2.1.6.2. Pequenos Ruminantes

Em ovinos e caprinos, conforme Motta *et al.* (2010), a infeção por *C. pseudotuberculosis* provoca a linfadenite caseosa, doença reconhecida e de importância mundial devido à sua alta prevalência e aos prejuízos económicos que pode causar. Esta enfermidade provoca quebras na produção de carne e de leite, depreciação da lã, atrasos de crescimento, défices nos índices reprodutivos dos rebanhos, rejeição de carcaças, gastos com tratamentos veterinários, refugo precoce e morte esporádica de animais.

A doença é caracterizada por lesões caseosas purulentas (granulomas) nos gânglios linfáticos e, ocasionalmente, nos pulmões, baço, rins e fígado. Esta enfermidade pode manifestar-se de duas formas: a linfadenite caseosa externa ou superficial, que é a forma

clínica mais frequente, caracterizando-se pela formação de abscessos em nódulos linfáticos superficiais, principalmente parotídeos, submandibulares, poplíteos, precurrais, supramamários, préescapulares e em tecidos subcutâneos; e a linfadenite caseosa interna ou visceral, forma subclínica, onde os abscessos se desenvolvem em nódulos linfáticos mediastínicos e bronquiais, assim como em órgãos internos, como os pulmões, rins, fígado e baço, no entanto, deve salientar-se que estas formas podem ocorrer simultaneamente no mesmo animal. Quando a infecção afeta o sistema respiratório, os sinais clínicos incluem perda de peso, dispneia, taquipneia e tosse crónica. Logo acredita-se que o envolvimento interno contribua para a síndrome da “ovelha magra”, a qual se caracteriza pela perda crónica de peso, subfertilidade, queda na produção de leite e redução no número de nascimentos de borregos (Motta *et al.*, 2010).

À palpação, existe um aumento de um ou mais linfonodos superficiais. Os abscessos, comumente, rompem-se, eliminando pus cremoso a caseoso, sem odor. Os caprinos apresentam maior proporção com lesões nos linfonodos que drenam a cabeça, possivelmente relacionadas a lesões superficiais durante o pastoreio. Em ovelhas, é comum a disseminação da infecção do linfonodo supramamário para o tecido mamário, acarretando uma redução na produção de leite. As infecções também podem ser assintomáticas, o que dificulta as análises epidemiológicas sobre a prevalência da doença (Radostits *et al.*, 2002).

O isolamento de *C. pseudotuberculosis* na espinal medula de um caprino foi descrito por Karimi *et al.* (2003).

#### 2.1.6.3. Equinos

Nos equinos, são reconhecidas duas formas clínicas de infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*: a linfangite ulcerativa e os abscessos na derme (Gomes *e. al.*, 2015).

A linfadenite ulcerativa era considerada de grande importância e amplamente distribuída durante a época do equino de trabalho. A infecção ocorre por meio de escoriações na zona distal dos membros e é mais frequente quando os equinos são alojados em grupos, em instalações sujas e sem higiene. O contacto é o principal meio de disseminação, no entanto, é provável que haja transmissão passiva pelas moscas (Radostits *et al.*, 2002).

É uma doença crónica que resulta na presença de nódulos, abscessos, úlceras e feridas localizadas nas extremidades distais dos membros. A infecção está associada à inflamação não supurativa de vasos e linfonodos. Os abscessos subcutâneos têm uma evolução crónica e estão localizados, principalmente, na região peitoral e ventral. Os equinos infetados podem

apresentar bacteriemia, abscessos internos (pulmão, pericárdio, peritoneu, rins, útero, mesentério, diafragma, etc.) e, mais raramente, abortos. A infecção é acompanhada de febre e perda de peso, e a taxa de mortalidade pode chegar a 40,5 %, na presença de abscessos internos (Gomes *et al.*, 2015).

#### 2.1.6.4. Suínos

Segundo um estudo realizado por Oliveira *et al.* (2014), o *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bióvar *Ovis*, foi isolado pela primeira vez em dez porcos pretos alentejanos em duas explorações de Odemira. O agente foi isolado a partir de amostras recolhidas de abscessos. A maioria dos animais infetados tinham menos de dez meses de idade, as lesões observadas eram especialmente abscessos com conteúdo purulento localizados nos linfonodos mandibulares e retrofaríngeos, apesar de também serem encontradas noutros locais. Cerca de 1% dos animais morreram devido a poliartrites e/ou infeções disseminadas noutros órgãos. Nos restantes casos a infecção foi controlada e os animais não foram rejeitados no matadouro.

#### 2.1.7. Diagnóstico

O diagnóstico de rotina das corinebacterioses é fundamentado nos achados clínicos e epidemiológicos. Na linfadenite caseosa em pequenos ruminantes a palpação dos linfonodos superficiais aumentados, aliados ao aspeto macroscópico dos exsudatos e à presença de febre, inapetência e emaciação são indícios da doença em ovinos e caprinos. O hemograma revela geralmente leucocitose com neutrofília, e monócitose, e anemia hemolítica do tipo macrocítica normocrómica. No entanto, estes achados não são patognomónicos da doença. Níveis aumentados de fibrinogénio podem ocorrer em animais com lesões abscedentes. Contudo, animais com abscessos crónicos, particularmente os pequenos ruminantes, podem apresentar parâmetros hematológicos normais. Na prática, o diagnóstico definitivo é firmado pelo cultivo do microrganismo, a partir do conteúdo dos abscessos obtidos por punção aspirativa ou extirpação cirúrgica (Motta *et al.*, 2010).

A análise microbiológica inclui a bacterioscopia direta e o cultivo do conteúdo dos abscessos nas corinebacterioses. Na rotina é utilizada a coloração de Gram e Giemsa. Na coloração de Gram, o microrganismo apresenta-se como cocobacilos Gram-positivos, irregulares ou pleomórficos lembrando “letras chinesas”. No meio de ágar-sangue ovino ou bovino (5%) desfibrinado, as colónias são observadas após aproximadamente 48 horas de

incubação, de aspeto diminuto, brancas e secas, rodeadas por um discreto halo de beta-hemólise. Como já referido, a prova de redução de nitrato a nitrito diferencia os biótipos em *ovis* ou *equi*, que apresentam, respetivamente, reações nitrato-negativas e nitrato-positivas. Diferentes técnicas são utilizadas como alternativas no diagnóstico das corinebacterioses, incluindo a citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) e métodos sorológicos. A citologia das lesões por *C. pseudotuberculosis* apresenta vantagens como baixo custo, simplicidade de execução, reduzida agressão no local da punção e a possibilidade de diagnóstico citológico, num curto espaço de tempo, quando comparada a histopatologia. Assim, a CAAF pode ser incluída como método prático no diagnóstico (Motta *et al.*, 2010).

Vários métodos sorológicos têm sido utilizados no diagnóstico das corinebacterioses. Estes ensaios sorológicos são baseados em técnicas de imunofluorescência indireta, microaglutinação, imunodifusão em gel de ágar, inibição sinérgica da hemólise, “western blotting”, fixação de complemento, ELISA e hemaglutinação indireta. Testes alérgicos também foram utilizados no diagnóstico da linfadenite caseosa (Motta *et al.*, 2010).

Os testes de inibição de hemólise apresentam sensibilidade maior que 95%, em alguns estudos realizados em ovinos e caprinos infetados, e uma sensibilidade muito baixa em outros. Em geral, os testes ELISA que usam antígenos da parede celular apresentam boa sensibilidade, mas moderada especificidade (Radostits *et al.*, 2002).

Apesar da boa sensibilidade em geral, os métodos sorológicos, segundo Motta *et al.* (2010), apresentam como desvantagens resultados falso-positivos, devido à similaridade antigénica entre as corinebactérias ou em animais vacinados contra a doença. Recentemente, foi utilizado no diagnóstico a amplificação do DNA bacteriano pelas técnicas de PCR. A técnica é altamente sensível e específica no diagnóstico. Porém, tem como limitação o custo de implantação inicial e eventuais reações cruzadas entre espécies geneticamente relacionadas, como *C. ulcerans* (Motta *et al.*, 2010).

#### **2.1.8. Achados microscópicos das Lesões**

As lesões nos linfonodos são características por apresentar necrose caseosa na zona central. Ao redor da zona central, encontra-se uma fina camada de macrófagos, células epitelioides, misturadas com neutrófilos e linfócitos, rodeados por uma fina camada de tecido fibroso (Sood *et al.*, 2012). Microscopicamente, a arquitetura do linfonodo é destruída pelo abscesso (Radostits *et al.*, 2002). A calcificação distrófica também pode ser observada em alguns locais (Sood *et al.*, 2012).



### **2.1.9. Achados Necroscópicos**

Os achados necroscópicos encontrados nas infecções por *C. pseudotuberculosis* são abscessos caseosos preenchidos com pus amarelo-esverdeado que ocorrem principalmente nos linfonodos e em menor extensão nos órgãos internos. Numa fase inicial, o pus é mole e pastoso e na fase final é firme e seco, com aparência lamelada característica. Também pode estar presente broncopneumonia com pus mais líquido e de coloração semelhante. A parede fibrosa limitante vai sendo refeita, formando-se camadas do tipo casca de cebola, notadas macroscopicamente (Radostits *et al.*, 2002).

### **2.1.10. Tratamento**

O *C. pseudotuberculosis* é sensível à penicilina G, à oxitetraciclina, aos macrólidos, às tetraciclinas, às cefalosporinas, à lincomicina, à associação trimetopim-sulfonamidas e à rifampicina. A sensibilidade aos aminoglicosídeos é variável, diferindo segundo os bióvars. Geralmente as linhagens do *biovar Ovis* são mais resistentes do que o *biovar Equi* (Gomes, 2015). No entanto, no tratamento *in vivo* o microrganismo é refratário, devido, provavelmente, à espessa cápsula de tecido conjuntivo que reveste os abscessos típicos e ao denso conteúdo caseoso presente no interior dos piogranulomas que dificultam a ação dos antimicrobianos. Outra propriedade de virulência é a viabilidade intracelular do microrganismo que limita a ação dos antibióticos convencionais. Assim sendo, os insucessos terapêuticos são creditados, geralmente, à dificuldade de obtenção dos níveis terapêuticos nos locais de infecção. Comumente os antimicrobianos escolhidos para o tratamento das infecções causadas por *C. pseudotuberculosis* são oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, trimetopim-sulfonamidas, penicilina e rifampicina (Motta *et al.*, 2010).

Em animais de grande valor zootécnico, a extração cirúrgica dos abscessos e/ou linfonodos externos é sugerida como parte do tratamento. A extração dos linfonodos, uma vez que retira o órgão de defesa regional, tem como inconveniente a predisposição à disseminação linfática e infecção de outros órgãos. Outra opção é a lancetagem dos nódulos, com limpeza diária até à cicatrização com compostos iodados, aliado ao tratamento parenteral prolongado até oito semanas com antimicrobianos (Motta *et al.*, 2010).

De acordo com um estudo realizado por Yeruham *et al.*, (2003), o tratamento parenteral com penicilina e amoxiciclina falharam, no que diz respeito aos bovinos com lesões granulomatosas ulcerativas e o tratamento local de todas as formas de lesões de pele foi

o mais efetivo. O facto da infeção por *C. pseudotuberculosis* ter ocorrido apenas uma vez em cada exploração infetada, durante o estudo, sugere que os animais podem ter adquirido alguma imunidade à doença.

A escolha de um fármaco leva em conta o teste de sensibilidade, o local da infeção (abcesso endurecido) e a toxicidade de certos antimicrobianos (Gomes, 2015).

#### **2.1.11. Controlo da doença e medidas profiláticas**

O *Corynebacterium pseudotuberculosis* é um organismo insidioso que é de difícil controlo, uma vez estabelecido num efetivo, pois a enfermidade é endémica, sendo quase impossível de erradicar. Nos programas de controlo, normalmente faz-se o refugo dos animais com abcessos recorrentes, o isolamento de animais infetados e lancetam-se os abcessos. A identificação dos animais infetados é muitas vezes difícil, uma vez que não se conseguem observar os abcessos internos. O uso de vacinas efetivas pode vir a ser um método mais promissível de controlo desta doença (Stanford *et al.*, 1998).

#### **2.1.12. Profilaxia através da vacinação**

A vacinação é considerada também como ação de profilaxia, reduzindo a ocorrência de abcessos no rebanho em até 70%. No entanto, em áreas endémicas, a vacina isoladamente não erradica a doença (Motta *et al.*, 2010).

A vacinação para controlo da linfadenite caseosa foi descrita inicialmente em 1957 por Quevedo. Várias têm sido as tentativas de vacinação, mas, entretanto, todas elas evidenciam apenas resultados insatisfatórios no que diz respeito aos índices de imunoproteção conseguidos em caprinos (Meyer *et al.*, 2002).

As vacinas formuladas de concentrados do sobrenadante de culturas com *C. pseudotuberculosis* inativado por formalina que contenham *fosfolipase D* apresentam considerável eficácia e encontram-se disponíveis em muitos países. A vacinação não confere proteção completa contra o desenvolvimento de abcessos, contudo, experiências de campo controladas mostram uma diminuição no número de animais que desenvolvem abcedação e redução do número de abcessos nos ovinos infetados. Sugere-se que a imunidade contra linfadenite caseosa esteja associada à atividade da antitoxina e, principalmente, seja mediada pelas células, mas a imunidade colostrar protege contra o desafio experimental nas primeiras seis semanas de vida. A imunidade colostrar afeta o desenvolvimento de imunidade pela vacinação, logo, os borregos de rebanhos que apresentem alta prevalência, só devem ser

vacinados após dez semanas de idade. Em caprinos, a vacinação parece menos eficaz, uma vez que apresenta pouca proteção contra infecção natural nas experiências de campo (Radostits *et al.*, 2002).

#### **2.1.13. Implicações na saúde pública**

A doença tem também uma importância zoonótica, uma vez que, apesar de raramente, pode causar linfadenite regional em humanos, principalmente em pessoas que trabalham com animais e inspetores de matadouros. É portanto, uma zoonose profissional pouco frequente, mas que não pode ser subestimada (Sood *et al.*, 2012).

A doença pode ser transmitida dos animais aos humanos, embora isto não seja uma condição necessária, uma vez que as *Corynebacterias* podem ser isoladas naturalmente na terra (Soerensen *et al.*, 1999).

Segundo Gomes (2015), em 1979, na Austrália, foram descritos 10 casos de linfadenite humana causada pelo *C. pseudotuberculosis*, sendo que alguns deles estavam associados aos pastores de ovelhas e funcionários de matadouros. Em 1979, outro registo de infecção foi observado num estudante de medicina veterinária com 28 anos que evidenciou um tipo especial de pneumonia eosinofílica adquirida no laboratório, tendo a bactéria sido isolada do aspirado transtraqueal e lavado bronquial. Em 1981, nos Estados Unidos, foi descrito um caso idêntico num americano urbano com uma história de ingestão de leite cru. Em 1995, em Espanha, foi descrito um caso de um pastor de ovelhas de 34 anos. Em 1997, na Austrália, foram descritos mais 10 casos de infecção humana. Em 2004, em Espanha, foi descrito, novamente, um caso numa jovem. Em 2005, em Hong Kong, existe o registo de um caso raro de infecção oftálmica devido ao *C. pseudotuberculosis*. Em 2006, em França, existe o registo de uma jovem de 12 anos de idade que apresentava linfadenite necrotizante causada pelo *C. pseudotuberculosis*.

A excisão cirúrgica dos linfonodos afetados é o procedimento básico e a terapia com antibióticos é o tratamento complementar. O diagnóstico pode ser tardio em alguns pacientes e noutros tem um curso clínico prolongado ou recorrente e/ou recuperação lenta (Gomes, 2015).

## 2.2. *Actinomyces bovis*

### 2.2.1. *Nota Histórica*

A actinomicose é uma enfermidade da antiguidade, tendo sido descoberta na mandíbula de um fóssil de rinoceronte e nas costelas de um homem descoberto no sudoeste de Ontário, no Canadá. No entanto, este organismo nunca foi convincentemente comprovado como uma causa de actinomicose em seres humanos. Em 1877, Bollinger e Harz, denominaram o género de *Actinomyces* quando descreveram a etiologia do agente da actinomicose bovina, chamaram-lhe *Actinomyces bovis*. O principal agente patogénico para os humanos, *Actinomyces israeli*, foi identificado por Israel, em 1878, em dois pacientes. Em 1891, Wolff e Israel descreveram suas características culturais e o seu crescimento anaeróbio. Desde então, estudos têm identificado outras espécies como: *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *A. pyogenes*, *A. denticolens*, *A. howellii*, *A. hordeovulneris* e *A. meyeri* em humanos, assim como em cães e gatos. A actinomicose é a doença infecciosa mais comum em cangurus. Em 1958, Batty isolou *A. odontolyticus* de pessoas com cáries dentárias em estádios avançados (Cone *et al.*, 2003).

### 2.2.2. *Classificação e descrição do Agente*

A classe *Actinobacteria*, segundo Markey *et al.* (2013), compreende um grupo heterogéneo de procariotas, contendo alguns géneros com capacidade para formar filamentos gram-positivos com menos de 1 µm de diâmetro. Assim, estas bactérias foram originalmente caracterizadas como fungos. No entanto, os fungos são eucariotas e os seus filamentos são sempre maiores que 1 µm de largura.

Os principais agentes patogénicos para os animais da classe *Actinobacteria* são encontrados no género *Actinomyces*, *Actinobaculum* e *Trueperella*, da família *Actinomycetaceae*, o género *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus* e *Nocardia*, da família *Corynebacteriaceae*, e o género *Dermatophilus*. Membros do género *Nocardia* estão intimamente relacionados com as espécies *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Rhodococcus*, mas as bactérias do género *Actinomyces* diferem destas na sua relação de guanina/citosina do DNA e na composição química da parede celular (Markey *et al.*, 2013).

Conforme referem Carter *et al.* (2001), todos os *Actinomyces* que causam doença nos animais e humanos são comensais da orofaringe. As espécies importantes, das vinte existentes, são as que se seguem: *Actinomyces bovis*: actinomicose em bovinos; *Actinomyces*

*viscosus*: pneumonia, piotórax e infecções subcutâneas em cães; *Actinomyces hordeovulnaris*: pleurites, peritonites, piotórax e artrite séptica em cães; *Actinomyces Naeslundii*: Infecções esporádicas em suínos em recuperação após aborto; *Actinomyces suis*: mastites piogranulomatosas em porcas; *Actinomyces israelii*: actinomicose em humanos.

Os *Actinomyces bovis* são microrganismos anaeróbios, filamentosos, ramificados, não formadores de esporos e de propriedades morfotintoriais Gram-positivas (Andrews *et al.*, 2008).

São habitantes naturais das membranas mucosas da cavidade oral, do aparelho respiratório superior e do aparelho digestivo da maior parte dos animais, (Antunes *et al.*, 2012).

As espécies de *Actinomyces* crescem bem em agar sangue de ovino ou bovino. O microrganismo requer condições anaeróbias com 5-10% de CO<sub>2</sub> adicionado (H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> comercial) e é incubado a 37° C. O *A. Bovis* normalmente requer entre dois a quatro dias de crescimento (Markey *et al.*, 2013).

### **2.2.3. Epidemiologia**

Os bacilos do género *Actinomyces* pertencem à microflora da cavidade oral e trato gastrointestinal de mamíferos e de humanos. O agente primário da actinomicose/osteomielite mandibular é o *Actinomyces bovis* (Antunes *et al.*, 2012).

É uma doença característica dos bovinos, com uma epidemiologia muito típica, que pode apresentar várias formas consoante as localizações no animal. A forma primária é a localizada na cabeça, normalmente na mandíbula ou maxila. Foram descritas também uma forma torácica e uma forma abdominal (Mas *et al.*, 2008).

Esta enfermidade é considerada de grande importância devido à sua ampla distribuição e à fraca resposta ao tratamento (Radostits *et al.*, 2002) e pelo facto de acarretar prejuízos económicos devido a perdas de peso ocasionadas pela dor durante a mastigação (Antunes *et al.*, 2012), sendo uma doença esporádica (Radostits *et al.*, 2002).

Em animais domésticos a actinomicose ocorre com maior frequência em bovinos e equinos, de diversas idades, enquanto em ovinos é considerada de ocorrência rara, (Antunes *et al.*, 2012). Podem também ocorrer casos eventuais em suínos (Radostits *et al.*, 2002).

A incidência é maior em bovinos alimentados com palha e silagem, uma vez que os alimentos grosseiros têm uma maior predisposição para provocar lesões orais. Esta doença

afeta todas as raças, idades e sexo de bovinos. Normalmente apenas uma pequena percentagem é afetada num determinado tempo (Kumar *et al.*, 2014).

A enfermidade é descrita em vários países do mundo (Radostits *et al.*, 2002), especialmente nos que têm bovinos criados em pastagens, onde se encontram variáveis taxas de prevalência (Andrews *et al.*, 2008).

#### **2.2.4. Transmissão**

Como já referido anteriormente, o *Actinomyces bovis* é um habitante comum da cavidade oral dos bovinos, supondo-se que a infeção ocorra por meio de ferimentos da mucosa oral, causada por fragmentos pontiagudos de alimentos ou de corpos estranhos. A infeção pode também ocorrer pelos alvéolos dentários. Em vitelos, a sua ocorrência dá-se especialmente aquando da erupção dentária. A infeção da parede do aparelho digestivo está possivelmente relacionada com lesões provocadas por corpos estranhos pontiagudos (Radostits *et al.*, 2002).

De acordo com a Pan American Health Organization (PAHO) (2001) a infeção não é transmitida de animal para animal.

#### **2.2.5. Patogenicidade**

Para exercer a sua ação patogénica, o *A. bovis* precisa de uma lesão prévia dos tecidos da cavidade oral, originando osteíte e osteomielites granulomatosas, que se localizam preferencialmente na mandíbula (Mas *et al.*, 2008).

A infeção é endógena, e as *Actinomyces* desenvolvem-se como saprófitas nos dentes com cáries, (PAHO, 2001).

Não foram identificados fatores de virulência específicos das espécies de *Actinomyces* (Markey *et al.*, 2013).

A actinomicose é uma doença crónica infecciosa onde é produzida uma osteomielite rarefeita nos ossos da mandíbula. Nesse local, e onde houver envolvimento visceral, a lesão é caracteristicamente granulomatosa (Radostits *et al.*, 2002).

Contribuem para as lesões granulomatosas evidentes tumefações, abscessos, trajetos fistulosos e fibrose extensa (Andrews *et al.*, 2008).

Não foram demonstradas exotoxinas associadas a esta bactéria (Carter *et al.*, 2001).

Os efeitos no animal são unicamente físicos. O envolvimento da mandíbula causa interferência na preensão e mastigação dos alimentos, e quando há envolvimento do trato

digestivo há interferência física nos movimentos do rúmen e digestão, resultando ambos em desnutrição parcial. Esporadicamente pode ocorrer em outros órgãos pela disseminação hematogênea das lesões primárias (Radostits *et al.*, 2002).

### **2.2.6. Manifestações Clínicas**

#### **2.2.6.1. Bovinos**

A actinomicose, conforme Tessele *et al.* (2014), caracteriza-se por uma osteomielite e, embora já tenha sido descrita em diferentes regiões anatómicas, como o pênis e a traqueia, a lesão clássica é localizada na mandíbula e, mais raramente, na maxila. A osteomielite desenvolve-se por extensão direta por infecção da gengiva ou periodontal ou através dos vasos linfáticos.

O *Actinomyces bovis* é a causa primária, mas outras bactérias podem estar presentes em lesões extensas (Radostits *et al.*, 2002).

Os sinais clínicos caracterizam-se pela presença de tumefações ou massas de consistência dura, localizadas nas regiões dos dentes molares ou pré-molares, preferencialmente na mandíbula e, ocasionalmente, na maxila. A presença de pus amarelado e grânulos de enxofre pequenos e duros observa-se principalmente nos casos em que há fistulização, (Antunes *et al.*, 2012). O osso infectado fica espessado como consequência dos múltiplos piogranulomas, que dão à superfície de corte do osso a aparência de um favo de mel (Tessele *et al.*, 2014).

O primeiro sinal clínico quando a maxila é afetada, pode ser dificuldade respiratória devido ao envolvimento dos ossos nasais. As alterações macroscópicas são caracterizadas por uma osteomielite proliferativa que altera a conformação dos ossos da mandíbula, causando danos nos dentes, com presença de tecidos de cicatrização abundantes e fístulas (Antunes *et al.*, 2012).

Segundo Dubarr *et al.*, (2004), a actinomicose adota três formas principais, de acordo com a localização das lesões: cervico-facial, torácica e abdominal. A forma cervico-facial pode iniciar-se como uma massa flutuante localizada debaixo da mandíbula ou com um abscesso doloroso, de progressão mais rápida, localizado na mesma zona, na região parotídea ou no pescoço. Esta forma de apresentação associa-se frequentemente a uma patologia crônica da cavidade oral. Posteriormente, o abscesso fistula a partir de várias fístulas, drenando um exsudado purulento que contem as drusas, concreções amareladas, esféricas, com mais de 1 mm de diâmetro. O processo pode disseminar-se através dos planos de continuidade dos

tecidos, podendo afetar a língua, as glândulas salivares, os ossos do crânio, e as meninges, entre outros. Na forma torácica o microrganismo pode instalar-se nos pulmões, através da aspiração das secreções orais, provocando necrose do parênquima e dando lugar à formação de abscessos similares aos que ocorrem na tuberculose pulmonar. Estes podem fistular através da pleura, parede costal e pele, drenando para o exterior. É frequente a ocorrência de dor torácica, febre, tosse com expectoração abundante e perda de peso. Na forma abdominal o microrganismo que está contido nas secreções orais ingeridas com o alimento, penetra através de lesões da mucosa gastrointestinal, provocando necrose dos tecidos e formação de abscessos na parede do estômago, intestinos e peritôneu. Outras Formas: Muito raramente as lesões podem localizar-se nas válvulas cardíacas, no cérebro, no reto ou ânus ou no tecido subcutâneo. Também se pode produzir uma actinomicose generalizada, fenómeno que ocorre através da disseminação hematogénia da bactéria, afetando assim vários órgãos.

#### *2.2.6.2. Pequenos ruminantes*

Em pequenos ruminantes a actinomicose é considerada uma afeção rara, visto que em animais de produção a doença é observada com maior frequência nos bovinos. A prevalência da actinomicose em pequenos ruminantes é maior em espécies silvestres, variando de 0,4% a 29,3% (Antunes *et al.*, 2012).

#### *2.2.6.3. Suínos*

Raros casos ocorrem em suínos devido a actinomicose visceral, sendo mais comuns as extensas lesões cutâneas granulomatosas, principalmente sobre o úbere (Radostits *et al.*, 2002).

#### *2.2.6.4. Equinos*

Segundo Nicolas (2007), a actinomicose não é uma doença incomum em veterinária, mas normalmente em equinos está mais associada a lesões no tegumento. No entanto, o autor descreveu pela primeira vez um caso de actinomicose num equino, com lesões na mandíbula, consequência de uma inflamação da gengiva.

#### **2.2.7. Diagnóstico**

As amostras para diagnóstico incluem pus, exsudados, tecidos e material proveniente de raspagens internas das paredes dos abscessos, caso se tenha efetuado incisão. A quantidade



de pus deve ser significativa. Secções finas de granulomas em formalina a 10% são úteis para o exame histopatológico (Markey *et al.*, 2013).

O diagnóstico de rotina é baseado nos achados epidemiológicos, sinais clínicos e exames complementares, que incluem cultivo microbiológico, exame radiográfico, esfregaços corados pelo método de Gram e histopatologia. A visualização de rosetas com clavas na histopatologia, somada ao seu isolamento e achados clínicos permitem confirmar o diagnóstico. A citologia aspirativa seguida de bacterioscopia é utilizada na rotina de diagnóstico de outras doenças, como nas infeções por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, possibilitando diagnóstico acurado, rápido, de simples execução e de baixo custo. Apesar da visualização de bacilos Gram-positivos de aspeto filamentoso na bacterioscopia, é necessário para o diagnóstico definitivo o isolamento do microrganismo e sua caracterização bioquímica, em virtude da similaridade da lesão bucal da actinomicose com a actinobacilose e nocardiose. Na actinomicose, a visualização de clavas pode ou não estar presente e sua ausência pode estar associada à regressão da lesão (Antunes *et al.*, 2012).

Os principais diagnósticos diferenciais são: actinobacilose causada pelo *Actinobacillus lignieressi*, abscessos ocasionados por *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus spp.*, e *Nocardia spp.* e corpos estranhos na cavidade oral (Antunes *et al.*, 2012).

#### **2.2.8. Morfologia Colonial e Aparência Microscópica**

As colónias de *Actinomyces bovis* são, não hemolíticas, são brancas, ásperas ou lisas e aderem muito bem em meios sólidos. As colónias nunca atingem um diâmetro superior a 1mm. Em colorações de Gram, as bactérias mostram-se Gram positivas, em forma de filamentos ligeiramente ramificados ou formas curtas. O *Actinomyces bovis* cresce bem em meio tioglicolato, tendo um crescimento difuso em cerca de 7 a 10 dias (Markey *et al.*, 2013).

Microscopicamente, conforme Mas *et al.* (2008), a lesão caracteriza-se pela formação de granulomas cujo centro é constituído por áreas de necrose, onde aparecem massas de bacilos e uma substância filamentosa e acidófila, originada por estes na periferia. Os fenómenos de calcificação podem acompanhar o processo. Rodeando esta zona aparecem grandes quantidades de neutrófilos, macrófagos e células gigantes multinucleadas. Por último, no estroma fibroso que rodeia o granuloma aparecem infiltrados de células plasmáticas e linfócitos.

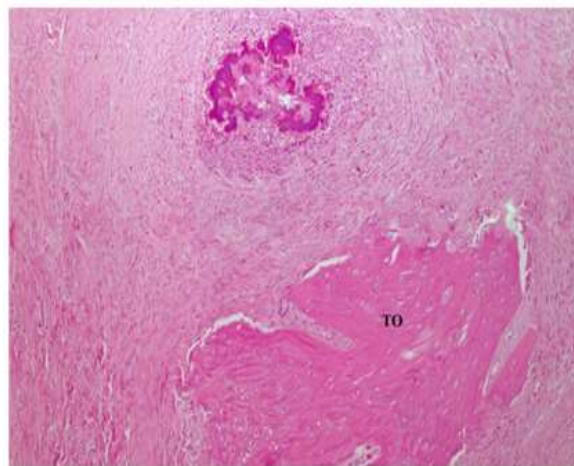


Figura 1 - Actinomicose em bovino: Osteomielite piogranulomatosa. Piogranuloma com bacilos filamentosos no centro no meio de trabéculas ósseas (TO). HE. Obj. 20x (Adaptado de Tessele *et al.*, 2014).

Na Figura 1, Actinomicose em bovino, verifica-se a presença de Osteomielite piogranulomatosa e Piogranuloma nas trabéculas ósseas (TO). No centro desses piogranulomas (porção central superior da figura) observam-se estruturas constituídas por uma massa interna de bacilos filamentosos que, na coloração de Gram, ficam coradas de azul, e uma periferia com clavas eosinofílicas, rodeadas por neutrófilos e macrófagos epitelioides (Tessele *et al.*, 2014).

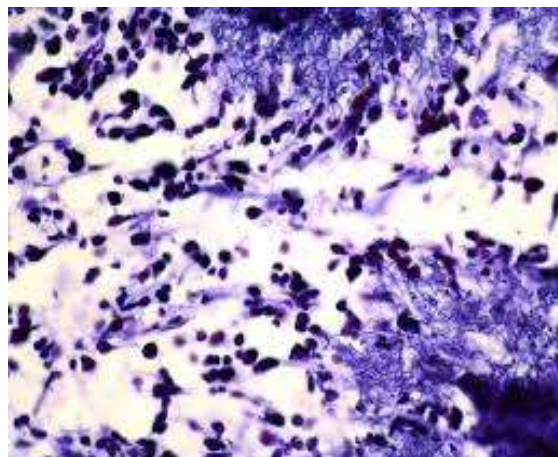


Figura 2 - Aspeto histológico da actinomicose bovino. Aglomerado de Bacilos filamentosos. MacCallum-Goodpasture. obj 100x (imersão) (Adaptado de Tessele *et al.*, 2014).

Na Figura 2, Aspeto histológico da actinomicose bovina, observa-se a presença de aglomerado de bacilos filamentosos (corados de azul), podendo ser observados nos cantos superior e inferior direito da figura (Tessele *et al.*, 2014).

### **2.2.9. Achados Necroscópicos**

À necropsia, segundo Radostits *et al.* (2002), é comum a observação de osso rarefeito, e a presença de cavidades e fístulas que contêm pus, semelhante a soro de leite, assim como pequenos grânulos arenosos. É constante uma reação tecidular extensa à volta da lesão, que pode disseminar-se para tecidos moles adjacentes. O que caracteriza a enfermidade é a presença de aglomerados de colônias que contêm típicas bactérias filiformes. Estas formações podem ser observadas no exame microscópico dos esfregaços de pus ou em exames de cortes histológicos. As lesões granulomatosas que contêm pus podem ser encontradas na goteira esofágica, região inferior do esófago e parede anterior do retículo. A disseminação dessas lesões pode causar uma peritonite local crônica. Os linfonodos locais não são afetados, independentemente do local da infecção (Radostits *et al.*, 2002).

### **2.2.10. Tratamento**

A relação entre o custo-benefício deve ser tida em conta no tratamento da actinomicose, já que as lesões crônicas de longa duração não respondem prontamente ao tratamento. Se as lesões forem pequenas e circunscritas podem ser removidas cirurgicamente. Noutros casos, a curetagem também pode ser realizada sobre os abscessos fistulados (PAHO, 2001).

A reduzida eficiência terapêutica na actinomicose é justificada pela dificuldade dos antimicrobianos em atingirem concentrações terapêuticas no interior do foco piogranulomatoso, muitas vezes recomendando-se a eutanásia (Antunes *et al.*, 2012).

Segundo um estudo realizado por Kumar *et al.* (2014), foi efetivo o tratamento de animais infetados com administração parentérica de penicilina em combinação com estreptomicina, juntamente com a administração oral de iodeto de potássio e o tratamento local das lesões com povidona de iodo.

Segundo Radostits *et al.* (2002), a estreptomicina, administrada por via intramuscular (5g/dia durante três dias) e repetida se necessário tem dado bons resultados nos casos de actinomicose em Bovinos, quando combinada com iodetos e tratamento cirúrgico local. O tratamento com iodetos, como o iodeto de potássio ou o iodeto de sódio, é ainda o tratamento padrão, tendo vindo a mostrar melhores resultados para a actinobacilose do que para a actinomicose. Os iodetos podem ser usados por via oral ou intravenosa. O iodeto de potássio administrado por via oral como beberagem aos bovinos, na dose de 6 a 10g/dia, durante 7 a 10

dias, é um tratamento demorado que o autor considera eficaz. Tanto em bovinos, como em ovinos, pode administrar-se iodeto de sódio a 10% na dose de 1g/12 kg de peso corporal por via intravenosa, em dose única.

Blowey *et al.* (2008) sugere a injeção de penicilina no local da lesão.

#### **2.2.11. Controlo da doença e medidas profiláticas**

O controlo da actinomicose é realizado evitando-se alimentos grosseiros. Os animais que já possuem lesões devem ser isolados do rebanho e as instalações devem ser devidamente desinfetadas (Antunes *et al.*, 2012).

A enfermidade não se dissemina rapidamente, a menos que fatores ambientais possam causar alta incidência de lacerações da cavidade oral (Radostits *et al.*, 2002).

#### **2.2.12. Implicações na saúde pública**

Como referido anteriormente, os bacilos do género *Actinomyces* pertencem à microflora da cavidade oral do trato gastrointestinal dos humanos.

Em seres humanos o agente mais comumente implicado nas infeções orais é o *Actinomyces israelii* (Antunes *et al.*, 2012).

A infeção em animais, segundo PAHO (2001), não é transmitida ao homem, nem é transmitida de pessoa para pessoa. As espécies de *actinomyces* que afetam o Homem são diferentes das que afetam os animais. Raramente é o *A. israelii* encontrado em animais ou *A. bovis* encontrado no homem. No entanto, alguns relatos referem o isolamento de *A. israelii* em animais e *A. bovis* no homem, como, por exemplo, um estudo realizado por Hidalgo *et al.* (1960), que relatou um caso de actinomicose cervicofacial num humano em que o agente etiológico foi o *A. bovis*.

Em estudos realizados em vários países foram encontrados *Actinomyces* em 40% das amígdalas excisadas, tendo sido isolados em 30% a 48% de amostras de saliva ou de material de dentes com cáries, bem como de secreções vaginais de 10% das mulheres que usam dispositivos contraceptivos intrauterinos (Hidalgo *et al.*, 1960).

### **2.3. Vacinas autógenas**

#### **2.3.1. História das vacinas autógenas**

No início do século XX, Sir Almroth Edward Wright desenvolveu a ideia da utilização de vacinas produzidas a partir dos agentes infecciosos isolados num dado paciente

para promover a cura desse mesmo paciente. Um dos principais interesses deste bacteriologista e imunologista inglês era o tratamento imunológico das infecções. Wright acreditava convictamente que a imunização era a chave para o tratamento das infecções tendo mantido esta opinião mesmo depois do aparecimento dos primeiros antibióticos (Turk, 1994).

A utilização terapêutica de vacinas baseava-se na inoculação, num local do corpo do paciente que não aquele afetado pela doença, de um produto inativado contendo a bactéria isolada do local de infecção. O objetivo seria estimular o sistema imunitário do paciente de modo a aumentar as defesas deste para que a infecção fosse combatida mais eficazmente. Para isso era necessário ter em atenção os seguintes aspetos: um diagnóstico bacteriológico completo e correto, o médico tinha que possuir conhecimentos de bacteriologia, de imunologia e das doses a utilizar em cada caso, tinha que existir uma ligação linfática entre o local de inoculação e o local da infecção, havia um limite quanto à eficácia das inoculações que dependia da capacidade de resposta individual de cada paciente, no caso de infecção crónica era necessário proceder a uma série de inoculações que não excluía a possibilidade de recaída até que o foco infeccioso tivesse sido completamente debelado e, por último, a dose a utilizar tinha que ser controlada pelo índice de opsonização (medida da capacidade fagocitária dos leucócitos do sangue) (Wright, 1910).

Sir Almroth Wright considerava que estas vacinas terapêuticas apenas deviam ser utilizadas em casos de infecções bacterianas localizadas e não nas situações de septicémia. Isto porque apenas no primeiro caso o organismo do paciente teria capacidade de resistência ainda não esgotada que podia ser estimulada pela inoculação da vacina (Wright, 1903).

Em veterinária, a primeira vez que se utilizou uma vacina autógena foi para a colibacilose (*Escherichia coli*) em suínos na década de 1970. Esta foi uma vacina oral. As vacinas autógenas foram desenvolvidas a partir do conteúdo intestinal de leitões com diarreia. Esses conteúdos foram cultivados em leite e administrados na alimentação de porcas prenhes um mês antes do parto. Segundo o autor, as vacinas autógenas de administração oral têm uma grande eficácia em doenças do trato intestinal (Chase, 2000).

### **2.3.2. Vacinas autógenas de uso veterinário, autovacinas e vacinas de rebanho**

Segundo o disposto na alínea o), do artigo 3.º, do Decreto-Lei n.º 148/2008, de 29 de julho, uma autovacina ou vacina de rebanho é “um medicamento veterinário imunológico inativado, preparado a partir de agentes patogénicos e de antígenos provenientes de um

animal ou de animais de uma exploração, utilizados no tratamento do animal ou dos animais da mesma exploração”.

As vacinas autógenas são utilizadas na criação de bovinos para tratamento de doenças infecciosas crónicas ou como tratamento terapêutico preventivo (Nolte *et al.*, 2001).

A vacinação terapêutica é uma alternativa à antibioterapia parenteral e pode ser usada durante um surto de doença. A vacinação de rebanho é aconselhável durante o período de transmissão da doença, se uma alta percentagem do rebanho estiver infetada e se houver um histórico de insucesso com os tratamentos convencionais nessas mesmas condições, nessa mesma exploração. A resposta clínica inicia-se dois a três dias após a vacinação, sendo uma alternativa importante, quando não houver condições para tratar e manejar a manada adequadamente (Hosie, 2004).

A vacina de rebanho mais comumente conhecida era utilizada contra a papilomatose bovina, no entanto segundo o disposto na alínea c), do artigo 92.º, do Decreto-Lei n.º 148/2008, de 29 de julho, foram proibidas em Portugal quais queres vacinas de rebanho produzidas a partir de vírus.

Segundo Flores, (2007) podem ser produzidas para a maioria das doenças bacterianas como as mamites. No entanto, segundo a alínea e), do artigo 92º do Decreto-Lei n.º 148/2008, de 29 de julho) as bactérias utilizadas não podem fazer parte objeto de planos de erradicação e controlo.

Em veterinária, uma autovacina pode ser usada no próprio animal a título curativo, mas dadas as possibilidades de contágio dos que estão no mesmo rebanho, em muitos casos, é aconselhável usar o mesmo microrganismo ou microrganismos da autovacina, para a formulação de vacinas de uso profilático nos animais ainda sadios do rebanho, conviventes com os doentes ou expostos à infeção, impedindo assim que se dissemine a doença (Cury, 1972).

Podem ser associados vários microrganismos na mesma vacina autógena, embora seja desaconselhável a incorporação de microrganismos sem significado, só pelo facto de se encontrarem no material clínico. Todavia, é evidente que, tendo as autovacinas uma concentração total de microrganismos, aproximadamente constante, sendo as doses pré-estabelecidas, quanto menos espécies de microrganismos contiver, maior será o estímulo antigénico específico para cada agente (Cury, 1972).

### ***2.3.3. Recolha de amostras para formulação de vacinas de rebanho***

O primeiro passo para iniciar um programa de vacinação de rebanho é nomear uma cultura do organismo que causa a doença. Um organismo bacteriano deve então ser identificado, pelo menos, o seu género e a espécie, se possível. A amostra pode ser enviada para um laboratório de diagnóstico. É aconselhável enviar amostras de diversos animais para a cultura. Se o mesmo microrganismo é encontrado em mais do que um animal, este representa uma melhor hipótese de ser o microrganismo causador da doença (White, 2007).

A seleção das espécies de microrganismos de amostras recolhidas, para incorporação numa vacina autógena não é, na prática, tão fácil quanto se poderia julgar. Em muitos casos surgem dúvidas sobre o papel patogénico de certos microrganismos. Já se tem observado casos de microrganismos considerados saprófitas desempenharem papel patogénico em certas ocasiões e sob determinadas condições. A recomendação, regra geral é, sempre que haja dúvida, incluir a espécie de microrganismo em questão na autovacina ou vacina de rebanho (Cury 1972).

O diagnóstico e sinais clínicos devem estar em consonância com o resultado obtido na identificação do microrganismo que foi cultivado. A seleção dos animais para se obter uma cultura adequada é muito importante. Um animal gravemente doente que não tenha sido tratado com antibióticos é a melhor escolha. As amostras devem ser recolhidas de forma mais asséptica possível. Consoante o tipo de amostra, estas devem ser armazenadas em recipientes estéreis adequados e identificados, devendo também ser colocadas em contentores, com pacotes de gelo para refrigeração e enviadas para entrega, de acordo com as diretrizes do transportador utilizado para fornecer a amostra para o laboratório (White, 2007).

### ***2.3.4. Processo de Produção das vacinas autógenas bacterianas inativadas de uso veterinário***

Após a receção da(s) amostra(s) o laboratório fará, então, o diagnóstico bacteriológico da afeção através do isolamento do(s) agente(s) bacteriano(s) responsável(eis) pelo aparecimento da doença na exploração pecuária (Carvalho, 2007).

O principal requisito para a formulação das vacinas autógenas consiste em estimular, ou pelo menos preservar, as qualidades antigénicas dos microrganismos (Cury 1972).

#### *2.3.4.1. Sementeira e Cultura*

O processo de produção das vacinas autógenas ou de rebanho inicia-se com a sementeira e cultura dos isolados bacterianos obtidos a partir das amostras colhidas dos animais doentes de uma determinada exploração. Estes processos são normalmente divididos em várias fases intercaladas por períodos de incubação a temperatura e atmosfera adequadas com o objetivo de criar uma concentração de cultura suficiente para a elaboração de um lote de vacina. As condições de incubação e os meios de cultura utilizados variam consoante o agente bacteriano em causa (Carvalho, 2007).

Os microrganismos podem ser utilizados para a produção de vacinas, durante 15 meses a partir da data de isolamento ou de 12 meses a partir da conclusão da primeira série de produção. Os microrganismos isolados a partir de uma unidade de produção animal só podem ser utilizados para fazer uma vacina autógena para essa exploração. Salvo raras exceções, se solicitadas pelo veterinário, podem ser feitas vacinas para serem utilizadas em unidades de produção não relacionadas (White, 2007).

#### *2.3.4.2. Inativação*

O segundo passo de produção, após a obtenção da concentração de cultura adequada, corresponde à inativação dessa mesma cultura através da adição de um agente inativante, o formaldeído em concentrações que variam entre 0,2% e 0,5%, podendo, em alguns casos, atingir 1%. A concentração do agente inativante utilizado depende do tipo de agente microbiano em causa e não deverá ser demasiado elevado. Caso isso aconteça, corre-se o risco de provocar a desnaturação das proteínas com a alteração dos respetivos antigénios. Para assegurar que as bactérias presentes são todas inativadas efetivamente, a cultura permanece em contacto com o agente inativante durante alguns dias, tendo esta que ser agitada regularmente no decorrer desse período. No fim deste processo é realizado um teste de controlo da eficiência da inativação através da sementeira das amostras de cultura num meio adequado, seguida de incubação a temperaturas e atmosfera apropriadas por um determinado período de tempo para se verificar se existe ou não crescimento bacteriano (Carvalho, 2007).

#### *2.3.4.3. Centrifugação*

O terceiro passo do processo corresponde à centrifugação, que tem como objetivo concentrar os microrganismos inativados e remover o agente inativante (Carvalho, 2007).



#### *2.3.4.4. Ressuspensão da cultura inativada*

De modo a permitir a realização da diluição final da cultura que se pretende utilizar na vacina, o concentrado de cultura bacteriana inativada resultante da centrifugação é novamente suspenso num soluto apropriado. Para se garantir que a concentração celular da diluição final da suspensão é adequada, esta é conferida por comparação com os padrões da Escala de McFarland. Esta concentração final pode variar consoante os microrganismos utilizados. Comummente utilizam-se culturas com uma concentração de aproximadamente  $1500 \times 10^6$  bactérias/mol, o que corresponde ao valor 5 da Escala de McFarland (Carvalho, 2007).

#### *2.3.4.5. Adição do adjuvante*

O adjuvante é utilizado com o objetivo de induzir uma resposta imunitária adequada aos animais aos quais a vacina é aplicada, uma vez que esta é inativada. O hidróxido de alumínio é usualmente utilizado como adjuvante (Carvalho, 2007).

#### *2.3.4.6. Acerto do pH*

Nesta fase, é realizada a verificação do pH da mistura e feito o acerto para valores entre 6,8 e 7. Uma vez que as vacinas se destinam a ser administradas por via parenteral, é indispensável que possuam um pH apropriado à homeostasia dos animais (Carvalho, 2007).

#### *2.3.4.7. Adição do agente conservante*

Para garantir a manutenção de boas condições da vacina durante o período de tempo em que está a ser aplicada aos animais e uma vez que estas vacinas são normalmente acondicionadas em recipientes com capacidade para múltiplas doses, é aceitável a adição de um agente conservante, como por exemplo o mertiolato de sódio (Carvalho, 2007).

#### *2.3.4.8. Enchimento*

A vacina é distribuída por um número de recipientes individuais adequados à dimensão do lote requerido, que são normalmente de vidro (Carvalho, 2007).

#### *2.3.4.9. Rotulagem*

Para garantir uma correta identificação do lote da vacina autógena, procede-se à rotulagem dos frascos, com a identificação do lote, podendo aquela conter também

informações referentes à posologia, modo de administração e conservação da vacina (Carvalho, 2007).

#### *2.3.4.10. Armazenamento e envio à exploração*

Por fim, a vacina é armazenada e enviada à exploração pecuária ou centro de atendimento médico-veterinário de destino. Estes procedimentos devem obedecer a condições de temperatura adequadas, entre 3° a 5° C (Carvalho, 2007).

#### *2.3.5. Reações adversas da vacinação*

A melhor maneira de proteger os animais contra as doenças infetocontagiosas é a vacinação, que continua a ser a única forma segura, confiável e eficaz. Normalmente a toxicidade associada às vacinas é rara, leve e transitória e os efeitos colaterais não devem prevalecer. No entanto, o uso de vacinas não está livre de riscos. Os riscos mais significativos associados à vacinação são a virulência residual, a toxicidade, as respostas alérgicas, o desenvolvimento da doença em animais imunodeprimidos, as complicações neurológicas e os efeitos prejudiciais aos fetos. Uma vez que as vantagens da vacinação são vastas e se encontram bem documentadas, o argumento sobre o risco associado à vacinação permanece, em grande parte, teórico (Tizard, 2014).

As vacinas desencadeiam frequentemente reações inflamatórias temporárias e um determinado grau de inflamação é indispensável para a indução de uma resposta imune protetora eficaz. A ocorrência de edemas no local da injeção é a reação mais comum. Os aumentos de volume locais podem ser edematosos ou sólidos e podem ser quentes ao toque. Estes observam-se aproximadamente um dia após a vacinação e podem durar cerca de uma semana. Os edemas deixam poucas marcas, a não ser que se desenvolvam abscessos (Tizard, 2014).

As vacinas com microrganismos Gram-negativos inativados têm tendência a provocar maiores reações, uma vez que podem ser intrinsecamente tóxicas devido à presença de endotoxinas, que podem causar a liberação de citotoxinas, podendo ocorrer choque, febre e leucopenia. As injeções múltiplas de antígenos nas vacinas inativadas estão mais frequentemente associadas a todas as formas de hipersensibilidade (Tizard, 2014).

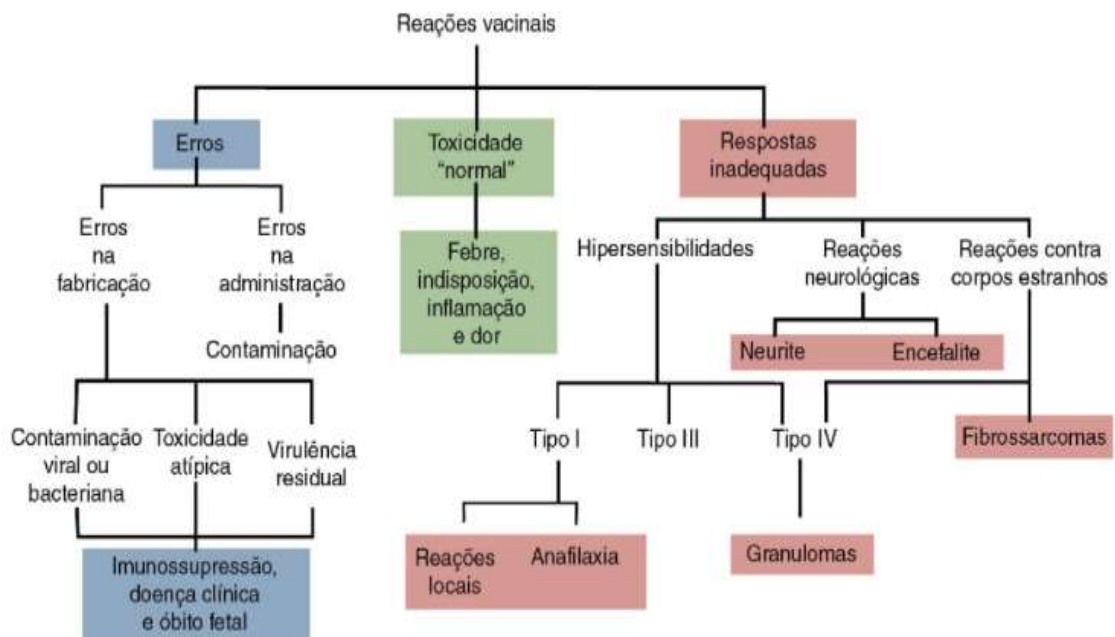


Figura 3 - Classificação simplificada dos principais efeitos adversos da vacinação (Tizard, 2014, p. 278)

Uma reação de Hipersensibilidade Tipo I é uma resposta imediata a um antígeno e ocorrendo dentro de poucas horas após exposição ao mesmo. As reações que ocorrem em mais de 2 a 3 horas após a administração da vacina provavelmente não são reação de hipersensibilidade tipo I. As reações de Hipersensibilidade tipo III também podem causar inflamação local intensa ou distúrbios vasculares generalizados, como a púrpura (Tizard, 2014).

### 2.3.6. Vantagens na utilização de vacinas autógenas de rebanho

As vantagens apresentadas para a utilização de vacinas autógenas são permitir o tratamento de algumas doenças que ainda não possuem vacinas específicas comercialmente

disponíveis e a sua utilização, não só como medida preventiva, mas também para o tratamento de infeções contínuas (Nolte *et al.*, 2001).

As vacinas autógenas específicas de rebanho, segundo White (2007), podem fornecer uma resposta rápida a problemas de doenças emergentes na indústria pecuária e podem ser uma ferramenta útil para o veterinário no combate a essas enfermidades.

Uma vacina convencional pode demorar cerca de 3 a 5 anos a ser licenciada, enquanto uma vacina autógena pode estar disponível entre 3 a 6 semanas, uma vez que o organismo é isolado do próprio animal doente. Além disso, alguns organismos alteram-se constantemente e não podem ser isolados em vacinas comerciais. À medida que novas estirpes ou variantes de um organismo são isoladas, podem ser incorporadas numa vacina autógena rapidamente. Por fim, não existem vacinas comerciais disponíveis para muitas doenças (White, 2007).

As vacinas autógenas podem ser económicas para o produtor, especialmente quando as combinações dos organismos necessários podem não estar disponíveis numa vacina comercial, ou seja, diferentes combinações de bactérias podem ser incorporadas numa única vacina (White, 2007).

A utilização de vacinas autógenas requer o envolvimento veterinário e um relacionamento veterinário-cliente-paciente (White, 2007).

As vacinas autógenas desde que cumpram os requisitos básicos de qualidade e segurança são, portanto, uma ferramenta muito útil na gestão da saúde e bem-estar animal, mas o seu uso deve ser restrito a situações em que não está disponível nenhum medicamento veterinário autorizado, e não devem ser utilizadas em substituição das boas práticas veterinárias ou consultórios veterinários (Hera *et al.*, 2004).

Os defensores das vacinas autógenas alegam que a imunização de resposta para os organismos patogénicos é absolutamente específica dentro de cada classe e que este princípio de especificidade se aplica com a mesma exatidão às diversas variantes de uma única espécie. Assim, concluem que, a menos que uma vacina seja da estirpe exata que causou a infeção, nenhuma resposta terapêutica pode ser obtida e que a única maneira de ter a certeza de que uma vacina corresponde absolutamente ao microrganismo infetante, é preparar essa vacina através dos microrganismos encontrados na área infetada (Sherman, 1916).

### ***2.3.7. Desvantagens na utilização de vacinas autógenas de rebanho***

Uma vez que nestas vacinas os agentes são mortos ou inativados, uma vacinação primária seguida de uma vacinação de reforço, em duas a três semanas, é necessária para obter uma resposta imune. Estas vacinas são sempre consideradas experimentais. O uso de vários antigénios em combinação pode ser antagónico, logo, algumas vacinas devem ser administradas separadamente (Chase, 2000).

Para o fabrico das vacinas autógenas, é necessária a incorporação de um adjuvante. No entanto, uma vez que para a utilização destes, são necessários testes extensivos para garantir que não provocam efeitos colaterais, estes tornam-se propriedade dos fabricantes de vacinas comerciais, o que limita a disponibilidade dos mesmos. Como resultado, muitas vezes, no fabrico de vacinas autógenas, os adjuvantes utilizados são menos eficientes, e assim as vacinas comerciais tendem a ter melhor qualidade (Chase, 2000).

### 3. Objetivos

O principal objetivo desta dissertação de Mestrado, realizada através de um estudo de caso, é, numa primeira instância, comprovar a presença de *Actinomyces bovis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* numa vacada, no Ribatejo.

Rever os principais aspetos na infeção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Actinomyces bovis* em bovinos, com ênfase nos fatores de virulência, epidemiologia, manifestações clínicas, métodos de diagnóstico, controlo, profilaxia e reflexos na saúde pública.

Comprovar a eficácia de uma vacina de rebanho polivalente, na redução dos sinais clínicos da doença granulomatosa ulcerativa causada por *Actinomyces bovis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, numa vacada naturalmente infetada, na tentativa de oferecer outra opção para o controlo de surtos, minimizando as perdas potenciais que a enfermidade causa.

Avaliar as reações locais consequentes à exposição dos antígenos vacinais.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Caracterização da exploração

A exploração em estudo localiza-se no distrito de Lisboa, concelho de Azambuja (Figura 4<sup>1</sup>). Trata-se de um Mouchão, Mouchão do Salgueiral, situado no leito do rio Tejo, com cerca de 92 hectares, dos quais 25 são alagados pela água da maré (Figura 5<sup>2</sup>).



Figura 4 - Localização geográfica do concelho da Azambuja, em Portugal continental



Figura 5 - Localização da exploração, Mouchão do Salgueiral, no concelho de Azambuja

A exploração tem como atividade a produção de bovinos de carne em regime extensivo. O efetivo é de 68 animais, dos quais 66 são fêmeas adultas, umas cruzadas de Charolês e outras cruzadas de Limousine, e 2 touros, 1 Charolês e 1 Limousine.

Assim, a exploração tem um encabeçamento de cerca de 0,74 cabeças normais/hectare.

<sup>1</sup> Figura 4 retirada de <https://www.google.pt/maps/place/Portugal/@39.5355326,-10.0964863,7z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0xb32242dbf4226d5:0x2ab84b091c4ef041!8m2!3d39.399872!4d-8.224454>

<sup>2</sup> Figura 5 retirada de <https://www.google.pt/maps/place/Azambuja/@39.0432677,-8.8384608,9625m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0xd18ddd75511bfd7:0xd221fe2e07aec0fb!8m2!3d39.0696027!4d-8.8692915>

#### ***4.1.1. Maneio Alimentar***

Em relação à alimentação dos animais, no inverno e primavera estes alimentam-se do pasto natural do terreno. No outono, além do pasto natural, quando a pastagem é insuficiente para alimentar os animais, a alimentação baseia-se na suplementação com feno e feno-silagem. Quando as vacas apresentam uma condição corporal muito baixa, são ainda suplementadas com o alimento composto designado “Tacos”. No entanto, esta necessidade é muito rara.

#### ***4.1.2. Maneio Reprodutivo***

No manejo praticado na exploração, os animais andam sempre juntos e os machos acompanham a vacada durante todo o ano. Os vitelos são desmamados apenas no momento da venda, que ocorre por volta dos 6 meses.

São efetuados todos os registos referentes aos partos, podendo-se calcular os intervalos entre partos, taxas de fertilidade, media de idade ao primeiro parto, identificar os animais improdutivos, entre outros parâmetros.

Os exames andrológicos referentes aos machos apenas foram efetuados aquando a compra dos mesmos.

Em relação à recria de substituição, são selecionadas vitelas descendentes da própria vacada, porém, nos dois anos anteriores, o produtor adquiriu cerca de quinze animais provenientes de outra exploração para o mesmo fim.

#### ***4.1.3. Maneio Sanitário***

Quanto ao estado sanitário, a exploração está oficialmente classificada como indemne, ou seja, negativa para peri-pneumonia contagiosa bovina, T3 (indemne de Tuberculose), B4 (indemne de Brucelose) e L4 (indemne de Leucose).

A profilaxia sanitária é realizada uma vez por ano e os animais são vacinados com uma vacina polivalente inativada que imuniza contra as Enterotoxémias, nomeadamente a Doença do Rim Pulposo (*Clostridium perfringens*, tipo D), a Gangrena Gasosa (*Clostridium perfringens*, tipo A, e *Clostridium sordellii*) e a Pasteureloses (*Pasteurella multocida*, tipo I de Roberts). No que diz respeito à desparasitação, esta é efetuada com Clorsulon + Ivermectina, duas vezes por ano.



## **4.2. Metodologia**

Este trabalho foi realizado com base num procedimento clínico não experimental, no seguimento de uma visita veterinária de rotina.

## **4.3. Recolha de Dados**

A exploração em estudo pertence ao atual proprietário á aproximadamente dez anos, sendo os animais provenientes de três locais diferentes da zona do Alentejo. O local da exploração onde se encontravam os animais era uma propriedade na zona do Cartaxo. No início do ano de 2014, o efetivo foi deslocado para o Mouchão do Salgueiral, atual local da exploração. Local este onde previamente já teriam habitado equinos e pequenos ruminantes.

Durante a anamnese foi possível concluir que a exploração em estudo não apresentava história anterior de ocorrência da enfermidade em estudo.

Até à atualidade, o produtor não mencionou a ocorrência de outros problemas clínicos de grupo com significância, a não ser casos clínicos individuais esporádicos.

## **4.4. Sinais Clínicos**

Segundo Gomes (2015), nos bovinos, o *C. pseudotuberculosis* pode ter muitas apresentações clínicas; no entanto, neste estudo, todos os animais afetados exibiram lesões sob a forma de abscessos drenantes. Estas lesões estavam localizadas essencialmente nas zonas da face, apresentando-se como únicas e isoladas ou múltiplas. As suas dimensões variavam desde pequenos abscessos subcutâneos de cerca de 2 cm de diâmetro a abscessos com diâmetro entre os 15 a 20 cm. A maioria dos abscessos ulcerava com facilidade, exceto os já ulcerados, drenando um exsudado purulento, inodoro, espesso e com coloração branco-amarelada, tingida com sangue.

Em novembro de 2014 surgiram três animais adultos, duas fêmeas e um macho, com abscessos subcutâneos na região facial retrofaríngea e mandibular. Uma das fêmeas apresentava-se com 2 abscessos, um na zona retrofaríngea e outro na zona mandibular (Figura 6 e 7), o macho na região mandibular (Figuras 8 e 9) e a outra fêmea na região retrofaríngea (Figura 10). Não foram observadas outras localizações.



*Figura 6 - Fêmea A com abscesso na zona retrofaringea, após lancetagem. (foto do autor)*



*Figura 7 - Fêmea A com abscesso na zona retrofaringea, após lancetagem. (foto do autor)*



*Figura 8 - Abscesso já fistulado do Macho. (foto do autor).*



*Figura 9 - Macho com abscesso na zona sub-mandibular. (foto do autor)*



*Figura 10 - Fêmea B com abscesso fistulado na zona retrofaringea, já cicatrizado (foto do autor).*

Durante a anamnese, o responsável pelos animais relatou que esses nódulos teriam aparecido anteriormente, cerca de uma a duas semanas.

À palpação dos abscessos, estes apresentavam-se de consistência dura, com fístula cicatrizada no centro, sinal de que já teriam ulcerado.

Ao exame físico, como se pode observar na tabela 2, os três primeiros animais que apresentaram sinais clínicos da doença, apresentavam-se em ótimo estado geral, sem outras alterações.

Animais	Idade (anos)	Frequência Respiratória (mrm)	Frequência Cardíaca (bpm)	Temperatura Retal (°C)	Movimentos Ruminiais em 1 minuto	Condição Corporal (escala de 1 a 5)
Fêmea A	8	28	68	38,5	1	3
Fêmea B	10	31	71	39	2	3
Macho	7	30	69	39	2	3

*Tabela 2- Indicadores do estado geral dos animais com sinais clínicos*

Após cerca de quatro meses depois dos três primeiros casos terem surgido, apareceram mais duas fêmeas adultas com abscessos. Uma das fêmeas apresentava um abscesso extenso na zona mandibular (Fêmea C) e a outra (Fêmea D) um pequeno abscesso subcutâneo na zona retrofaríngea. À palpação, estes abscessos encontravam-se de consistência mais mole que os primeiros, sem sinais de ulceração.

Estes dois animais também apresentavam um exame físico sem outros sinais sistêmicos, como se pode verificar na tabela 3.

Animais	Idade	Frequência Respiratória (mrm)	Frequência Cardíaca (bpm)	Temperatura Retal (°C)	Movimentos Ruminiais em 1 minuto	Condição Corporal (escala de 1 a 5)
Fêmea C	5	31	70	38,5	2	3
Fêmea D	6	29	68	38,5	2	2

*Tabela 3 – Indicadores do estado geral dos animais com sinais clínicos*

#### 4.5. Colheita de amostras

De forma a confirmar o diagnóstico presuntivo, elaborado com base na prevalência dos agentes, na época do ano e na observação dos sinais clínicos encontrados, uma primeira amostra foi recolhida a 23 de novembro de 2014, para pesquisa de *Actinobacillus lingnieresii*<sup>3</sup>.

Apesar do resultado da análise não ser conhecido, foi solicitado também um teste de sensibilidade aos antibióticos<sup>4</sup> para se poder instituir um tratamento imediato, como forma de reduzir a propagação da doença.

O material enviado para laboratório foi uma zaragatoa com o conteúdo de um abcesso lancetado do primeiro animal com sinais clínicos, fêmea A.

Esta pesquisa foi realizada, uma vez que, como referido na pesquisa bibliográfica, a Actinobacilose é um dos diagnósticos diferenciais prováveis para os sinais clínicos apresentados pelos animais.

Realizou-se a tricotomia da superfície do abcesso, de seguida fez-se a assepsia com iodopovidona (Betadine®), e devido às lesões já se apresentarem fistuladas, optou-se por se lancetar o centro do abcesso com uma lâmina de bisturi estéril, e por fim, com uma zaragatoa, recolheu-se o conteúdo do interior do abcesso, já bastante escasso, uma vez que este já teria drenado. Foi colocado spray de oxitetraciclina no fim do procedimento.

A amostra foi enviada no próprio dia para o laboratório produtor de vacinas de rebanho.

Como a primeira análise microbiológica solicitada não teve o resultado esperado, houve necessidade de se recolher uma segunda amostra<sup>5</sup> para nova pesquisa do agente etiológico. Esta amostra foi recolhida a 25 de março de 2015, da Fêmea D, uma vez que era o animal que apresentava o abcesso de consistência menos dura e sem fístula aparente.

Optou-se pela realização de uma punção aspirativa (PAAF) do abcesso, para recolha de uma amostra com o mínimo de contaminação secundária. Inicialmente, realizou-se a tricotomia e assepsia da região com iodopovidona (betadine). Para realização da punção, utilizou-se uma agulha 16G e uma seringa de 20 ml, ambas estéreis. O conteúdo aspirado apresentou característica caseosa. Após a colheita, a amostra (Figura 11 e 12) foi encaminhada para o laboratório produtor de vacinas de rebanho, para realização de cultura e identificação dos agentes etiológicos.

---

<sup>3</sup> Vide in Anexo I

<sup>4</sup> Vide in Anexo II

<sup>5</sup> Vide in Anexo III



Figura 11 - Amostra recolhida do abscesso  
(foto ao autor)



Figura 12 - Amostra recolhida do abscesso  
(foto ao autor)

#### 4.6. Tratamento Instituído

Todos os animais que apresentavam abscessos foram separados da manada, ficando isolados, de modo a evitar a propagação da doença. Após a recolha das amostras, os abscessos foram drenados e desinfetados com iodopovidona (Betadine®) e spray de oxitetraciclina.

Apesar da dificuldade dos antibióticos em atuar dentro da capsula dos abscessos, como referido na pesquisa bibliográfica, foi administrada oxitetraciclina injetável aos animais que foram isolados com base no resultado laboratorial do teste de sensibilidade aos antibióticos<sup>6</sup>.

Na tentativa de um tratamento efetivo e definitivo dos animais, tendo em consideração que se trata de uma patologia infecciosa, para a qual não existem vacinas comerciais disponíveis, optou-se pela realização de uma vacina de rebanho polivalente, efetuada com os agentes isolados da segunda amostra enviada (*Actinomyces bovis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*).

Segundo o Laboratório onde a vacina foi requerida, foi a primeira vez que esta vacina de rebanho foi solicitada em Portugal com os dois agentes em conjunto, *Actinomyces bovis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Foi também a primeira vez que o último agente mencionado foi requisitado em Portugal numa vacina para aplicação em bovinos.

A vacina foi formulada consoante os procedimentos descritos na pesquisa bibliográfica.

---

<sup>6</sup> Vide in Anexo II

Foram vacinados, em maio de 2015, todos os animais adultos do efetivo, sessenta e seis fêmeas e dois machos. Os vitelos não foram vacinados, pois não apresentavam idade adequada e por se destinarem a venda. A vacina foi administrada individualmente numa dose de 5 ml, pela via subcutânea, do lado direito da tábua do pescoço.

Por exigência do laboratório foram vacinados três animais teste com o dobro da dose para avaliação de reações vacinais significativas, sendo que lhes foi administrado 10 ml da vacina.

Foi realizado o rapel um mês após a primeira vacinação.

Tendo em conta que um dos inconvenientes da vacinação são as reações vacinais locais, foi realizada uma medição dessas reações, três dias após a primeira vacinação e um mês após a mesma, antes do rapel.

#### **4.7. Cálculo da Taxa de prevalência antes da Vacinação**

A taxa de prevalência refere-se ao número de casos de uma doença, numa população conhecida, num determinado período de tempo, sem distinção entre os casos antigos e os novos casos. Pode ser simplesmente definida como o número de animais afetados, sendo comumente expressa em termos do número de animais doentes em relação ao número de animais da população em risco de desenvolver a doença (Thrusfield 1986).

$$\text{Taxa de Prevalência \%} = \frac{\text{Nº de animais doentes num determinado momento}}{\text{Nº de animais em risco nesse determinado momento}} \times 100$$

(Thrusfield, 1986).

#### **4.8. Cálculo da Letalidade:**

A taxa de letalidade mede a severidade de uma doença e é definida como a proporção de mortes de entre aqueles doentes por uma causa específica em um certo período de tempo (Bonita *et al.*, 2006).

$$\text{Letalidade \%} = \frac{\text{Nº de mortes de uma determinada doença num certo período}}{\text{Nº de doentes por determinada doença no mesmo período}} \times 100$$

(Bonita *et al.*, 2006)

## 5. Resultados

### 5.1. Diagnóstico

O resultado da primeira amostra enviada para pesquisa de *Actinobacillus lignieresii*, agente da Actinobacilose, foi negativo.

Para a segunda amostra enviada, o resultado da pesquisa foi *Actinomyces bovis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, este último, pouco esperado, uma vez que, segundo a pesquisa bibliográfica, é bastante raro em bovinos.

### 5.2. Taxa de Prevalência da doença antes da vacinação

$$P \% = \frac{5}{68} \times 100 = 0,073 = 7,3\% \cong 7\%$$

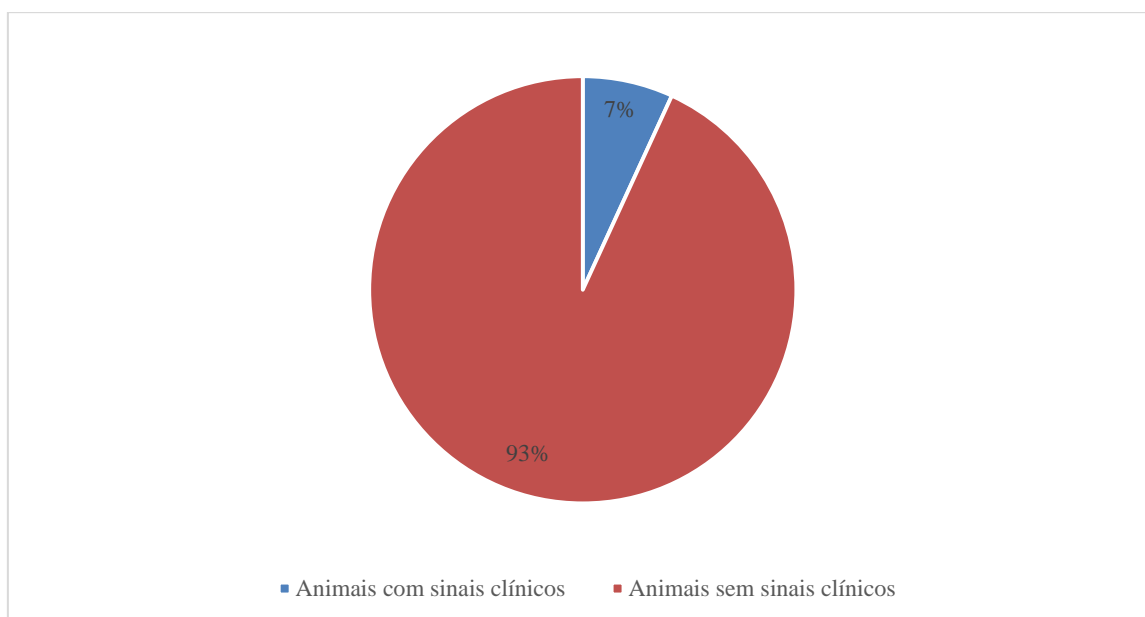


Gráfico 1 - Taxa de Prevalência da Doença antes da Vacinação. A taxa de prev

A taxa de prevalência da doença antes da vacinação foi 7%, visto que 5 do total de 68 animais da exploração apresentaram sinais clínicos.

### 5.3. Taxa de Letalidade da Doença

$$L \% = \frac{0}{5} \times 100 = 0 \%$$

#### 5.4. Taxa de Prevalência da Doença 1 ano após a Vacinação

$$P \% = \frac{1}{68} \times 100 = 0,014 = 1,4\%$$

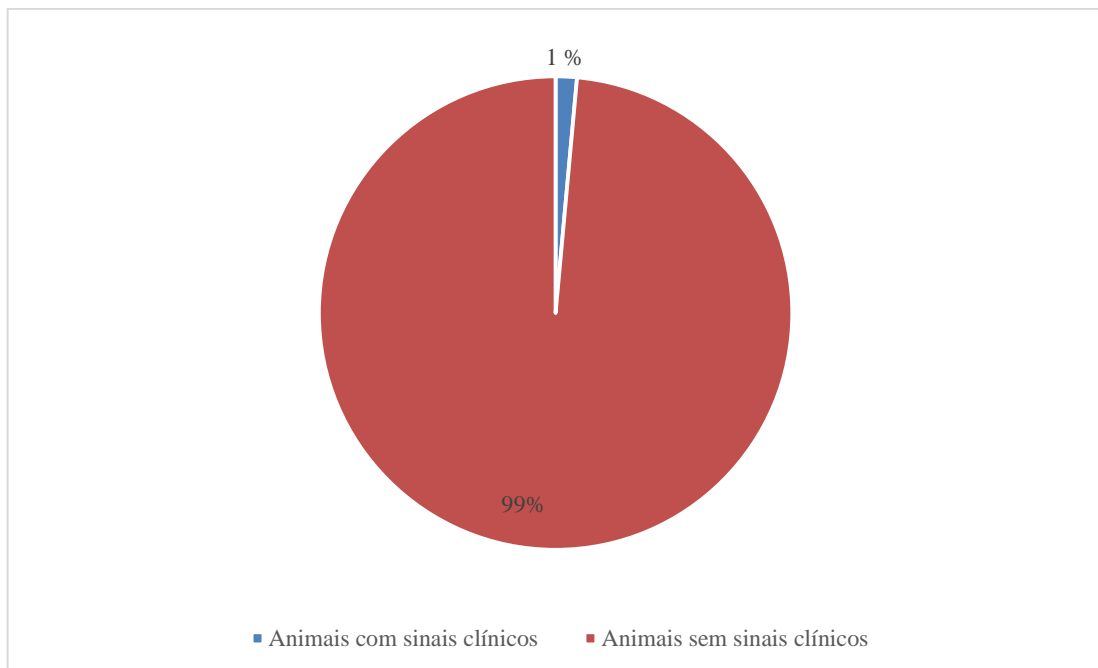


Gráfico 2 - Taxa de Prevalência da Doença um ano após vacinação

Após a vacinação a taxa de prevalência da doença foi de 1%, uma vez que apenas 1 animal do total de 68 animais da exploração apresentou sinais clínicos.

#### 5.5. Taxa de Incidência da doença um ano após a vacinação

A incidência refere-se à velocidade com que novos acontecimentos ocorrem numa determinada população. A incidência leva em conta o período de tempo em que os indivíduos estão livres da doença, ou seja, em risco de desenvolvê-la.

A incidência indica o número de casos novos ocorridos num determinado período de tempo numa população específica, enquanto que a prevalência se refere ao número de casos (novos e velhos) encontrados numa população definida num determinado ponto no tempo (Bonita *et al.*, 2006).

$$\text{Incidência \%} = \frac{\text{Nº de novos casos de doença durante um período específico de tempo}}{\text{população em risco}} \times 100$$

(Bonita *et al.*, 2006)



$$I \% = \frac{1}{68} \times 100 = 0,014 = 1,4\%$$

Apenas um animal apareceu com sinais clínicos um ano após a vacinação. Todos os animais que se encontravam com sinais clínicos antes da vacinação, deixaram de apresentar os mesmos um ano após aplicação da mesma.

## 5.6. Cálculo da Morbidade

A principal razão pela qual se calcula a morbidade é para a percepção da extensão de uma doença na população. Esta percepção só é possível quando o número de animais doentes é comparado com o número de animais da população (Thrusfield, 1986).

O cálculo da morbidade foi obtido com base na seguinte fórmula:

$$\text{Morbidade} = \frac{\text{n.º de animais afetados pela doença}}{\text{n.º total de animais na exploração}} \quad (\text{Thrusfield, 1986}).$$

$$\text{Morbidade} = \frac{6}{68} = 0,088$$

## 5.7. Reações vacinais

As reações vacinais foram classificadas quanto à gravidade em: G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub> e G<sub>4</sub>, sendo que G<sub>0</sub> não apresenta reação vacinal, G<sub>1</sub> granuloma vacinal com até 2 cm de diâmetro, G<sub>2</sub> de 2 a 4 cm, G<sub>3</sub> de 4 a 6 cm, e G<sub>4</sub> acima de 6 cm (Tabela 4).

Os três animais teste, que foram vacinados com o dobro da dose da vacina (10 ml) não apresentaram reações vacinais locais.

Gravidade das Reações Vacinais	Avaliação após três dias da vacinação (n.º de animais)	Avaliação após um mês da vacinação (n.º de animais)
G <sub>0</sub>	59	68
G <sub>1</sub>	9	0
G <sub>2</sub>	0	0
G <sub>3</sub>	0	0
G <sub>4</sub>	0	0

*Tabela 4 - Reações vacinais observadas três dias e um mês após vacinação*

### **5.8. Profilaxia e Controlo**

O plano de controlo instituído para evitar novos surtos na exploração baseou-se em 4 passos:

1. Isolamento e tratamento local de todos os casos clínicos que surgirem, evitando assim a propagação dos agentes através das secreções drenadas pelos abscessos.
2. Maior cuidado no fornecimento de forragens muito grosseiras, evitando assim a ocorrência de feridas ou abrasões na zona bucal.
3. Maior controlo na entrada de animais provenientes de outras explorações, de forma a evitar a entrada de novos agentes infecciosos na exploração. Caso se verifique a necessidade de entrada destes, é importante conhecer o estado sanitário da exploração de proveniência e efetuar a quarentena e a vacinação antes da entrada dos mesmos na exploração.
4. Passa a efetuar-se revacinação anual de todos os animais adultos da exploração e, se for o caso, de todos os animais para recria.

## 6. Discussão

Com este trabalho pretendeu-se avaliar a eficácia de uma vacina de rebanho, no tratamento e prevenção de uma infeção, cujos agentes etiológicos são *Actinomyces bovis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, numa exploração localizada no concelho de Azambuja, região do Ribatejo.

Avaliou-se, também, a ocorrência de reações vacinais locais após a vacinação.

Segundo Sood *et al.* (2012), a infeção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* é raramente observada em bovinos, o mesmo não se verificando com *Actinomyces bovis* que, segundo Mas *et al.* (2008), é uma doença característica destes.

Uma das possíveis causas do aparecimento súbito da infeção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* na exploração em estudo pode ter sido o facto de os animais terem sido deslocados de um local para outro, cerca de um ano antes do aparecimento dos sintomas, uma vez que, de acordo com Motta *et al.* (2010), o *C. pseudotuberculosis* tem capacidade de resistência ambiental por longos períodos de tempo, mesmo sob situações adversas de exposição à luz solar direta ou dessecação.

Outra possível causa, pode ter sido o facto de o produtor ter introduzido na exploração animais provenientes de uma outra exploração, com alguns casos de sinais sugestivos da mesma doença, cerca de um ano e meio antes do aparecimento dos primeiros animais com a doença, pois, conforme Yeruham *et al.* (2003), a infeção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, pode ser transmitida entre explorações através da introdução de animais infetados em explorações livres de doença.

O facto de ser verão, época em que ocorreram os casos clínicos, pode explicar a ocorrência de infeção por *Actinomyces bovis*, uma vez que, segundo Kumar *et al.* (2014), os alimentos grosseiros, mais comuns nesta época do ano, têm uma maior predisposição para provocar lesões orais, e assim permitir a infeção pelo agente.

Estes três fatores, aliados, podem explicar a infeção em simultâneo pelos dois agentes.

Neste estudo, o diagnóstico de *Actinomyces bovis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, foi efetuado através da recolha de amostras no local das lesões e envio para laboratório para identificação e isolamento das bactérias.

Após a identificação e isolamento dos dois agentes, e uma vez que não existe nenhuma vacina específica comercialmente disponível, decidiu-se optar pela produção de uma vacina de rebanho para aplicação nos animais da exploração. É de referir que, conforme refere

Nolte *et al.* (2001), as vacinas de rebanho permitem a utilização não só como medida preventiva, mas também como tratamento de infecções contínuas.

Como já referido anteriormente, segundo o laboratório onde a vacina foi formulada, foi a primeira vez que esta vacina de rebanho foi solicitada com os dois agentes em conjunto, *Actinomyces bovis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Foi, também, a primeira vez que o *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi requisitado numa vacina para aplicação em bovinos, uma vez que normalmente é solicitada para a linfadenite caseosa em ovinos e caprinos.

Perante os resultados, pode observar-se uma diminuição de 5,6% na Taxa de prevalência da doença um ano após a vacinação, uma vez que antes da vacinação a taxa de prevalência era de 7% e após a vacinação era de 1,4%, assim como a taxa de incidência.

A letalidade associada à doença foi de 0% e todos os animais afetados recuperaram na totalidade, sem outras complicações.

Na avaliação das reações vacinais locais, pode afirmar-se que não houve reações locais significativas, já que apenas nove dos animais vacinados apresentaram edemas locais com até 2 cm de diâmetro, três dias após a vacinação, ou seja hipersensibilidade tipo I. Nenhum dos restantes animais vacinados apresentou reações, inclusivamente os três animais teste aos quais foi administrado o dobro da dose.

Tendo em consideração que ainda não existem, na bibliografia, estudos realizados sobre a eficácia de vacinas de rebanho para estes dois agentes, não é possível estabelecer relações sobre o tema em estudo. No entanto, pode-se afirmar que, neste caso, a vacina foi eficaz no tratamento da infeção provocada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Actinomyces bovis*, na exploração de bovinos em estudo. Aconselha-se, deste modo, a utilização da vacina de rebanho no controlo e tratamento desta enfermidade.

Foi de extrema importância a atuação logo no início do surto da doença, prevenindo assim a propagação dos agentes dentro da exploração, evitando o aparecimento de mais casos clínicos e facilitando o controlo da doença.

## 7. Conclusão

Este estudo de caso pretendeu demonstrar como pode ser abordado um problema sanitário num efetivo de carne, identificando o problema e tomando decisões para resolução do mesmo. Esta abordagem só é possível quando há cooperação por parte do produtor e do Médico Veterinário.

Em Portugal, não há bibliografia sobre infeções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em bovinos, nem sua prevalência. A doença é quase totalmente desconhecida nesta espécie.

A revisão bibliográfica aqui apresentada pode ser uma mais-valia para futuros trabalhos nesta área. Pretendeu-se também, desta forma contribuir para o aumento da divulgação e conhecimento da doença.

A ausência de vacinas no mercado para prevenção de diversas doenças de etiologia bacteriana, com impacto na saúde animal e rendimento económico nas espécies pecuárias, tem levado a uma maior procura de alternativas como o uso de vacinas de rebanho. Assim, estes produtos são utilizados como um instrumento de profilaxia e tratamento para o controlo de infeções bacterianas.

Apenas o Médico Veterinário tem capacidade técnica para avaliar a situação clínica dos animais e para decidir se a estratégia mais correta para controlo desta passa pelo recurso ao uso de uma vacina de rebanho. As vacinas de rebanho não devem ser utilizadas quando existem no mercado vacinas devidamente autorizadas e eficazes.

Perante os resultados, sugere-se a utilização de vacinas de rebanho no tratamento e prevenção de animais infetados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Actinomyces bovis*.

Dentro da literatura consultada, infere-se pela primeira vez no país a utilização desta vacina para esta afeção em bovinos.

Em suma, os dados obtidos neste estudo realçam a importância da intervenção do Médico Veterinário, no controlo e prevenção da evolução de doenças em Portugal.

## Bibliografia

- Andrews, A.H., Blowey, R.W., Boyd, H., Eddy, R.G. (2008). *Medicina Bovina, Doenças e Criação de Bovinos*. (2.<sup>a</sup> ed, pp. 727). Roca Lda.
- Antunes, J.M.A.P., Almeida, A.C.S., Ribeiro, M.G., Amorim, R.L., Hussini, C.A., Listoni, F.J.P., *et al.* (2012). *Actinomicose Mandibular em Ovino: Relato de Caso*. São Paulo: Arq. Inst. Biol. Vol. 79, n.º 3, pp. 405-409.
- Belchior, S.E., Gallardo, A., Abalos, A., Jodor, N., Jensen, O., (2006). Atualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Rev.Vet. Argent.*, 23, pp. 258-278.
- Bonita R., Beaglehole R., Kjellstrom T., *Epidemiologia Básica*, 2ª edição, Ordem Mundial de Saúde, 2006. Acedido outubro 4, 2016, em [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43541/5/9788572888394\\_por.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43541/5/9788572888394_por.pdf).
- Bowersock, T.L. (2002). Evolving importance of biologics and novel delivery systems in the face of microbial resistance. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* 4: artigo 33.
- Camargo, E.V., Barboza, C.S., Krewer C., Vargas A.P.C., Cecim M., Leal M.L.R., 2010 Isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no sêmen de um carneiro na região central do Rio Grande do Sul: Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.77, n.1, p.139-142, jan/mar.
- Carter, G.R., Wise, D. J. (2001). *Essencial of Veterinary Bacteriology and Mycology*. (6.<sup>a</sup> Ed. Pp. 199-202), Iowa State Press.
- Carvalho, S.D.F.S.M. (2007). *Enquadramento Regulamentar das Vacinas Autógenas de Uso Veterinário e Caracterização da Sua Utilização em Portugal*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia - Universidade de Lisboa, Portugal.
- Chase C., (2000). *The pros and cons of using Autogenous hog vaccine*, Nat. hog. Farmer, Acedido em 2 de dezembro de 2015, em: [http://m.nationalhogfarmer.com/mag/farming\\_pros\\_cons\\_using](http://m.nationalhogfarmer.com/mag/farming_pros_cons_using)
- Chiareli, D.; Cosate, M.R.V.; Moreira, E. C.; Leite, R. C.; Lobato, F.C.F.; DA Silva, J. A.; Teixeira, J.F.B.; Marcelino, A. P. (2012). *Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais*. Pesquisa Veterinária Brasileira. [online]. Rio de Janeiro, vol.32, n.º 7, p. 633-639.
- Cury R., (1972). Autovacinas, técnicas de prepare e fatores de Eficiência, *Rev. Saúde Pub.*, São Paulo, 6: 371-83.

- Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Oliveira, S. C., Miyoshi, A., Azevedo, A. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. EDP Sciences. *Vet. Res.* 37, 201-218.
- Dubarry, J., Alvarez, A.R., Erreira, A., Maria, A., Vera, O., Vespoli, P. V., et al. (2004). *Actinomycosis y Actinobacilosis: Una Causa Frecuente de Lesiones Granulomatosas en los Bovinos del Departamento Maracó de la Provincia de la Pampa- Republica Argentina*, Clinica Veterinária, vol. 6, nº 1.
- Farooq, U., Qayyum, A., Samod, H.A., Chaudhry, H.R., Ahmod, N., (2010), Field Surgical Intervencion of Bovine Actinomycosis. *Pakistan Veterinary Journal*, 30(4), 249-250.
- Flores, E.F. (2007) Virologia Veterinária. Santa Maria: UFSM, p. 888.
- Gomes, J.P., Marcos. (2015). *Genero Corynebacterium, Rhodococcus e Truperella spp*, FAVET-UFRGS, Acedido em 7 de outubro de 2015, em: [http://www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero%20Coryne-Rhodo-Trueperella%204-2015\\_0.pdf](http://www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero%20Coryne-Rhodo-Trueperella%204-2015_0.pdf)
- Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, G. & Thoen, C. (2010). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. (4.<sup>a</sup> Ed.). Wiley-Blackwell.
- Hera A., Bures J. (2004). *Veterinary autogenous vaccines*, Dev. Biol.(Basel), 117:19-25.
- Hidalgo W.R., Hidalgo H.X., Cappella E.R., Solano E., (1960). Un caso de Actinomicosis Cervicofacial por *Actinomyces Bovis*. *Rev. de Biol. Tropical* 8(2):155-163.
- Hosie B., (2004) Footrot and lameness in sheep. *The Veterinary Record*, v. 154:37-38.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinan, A., Maguine, D. (2013). *Clinical Microbiology*, (2.<sup>a</sup> ed.; pp. 135-160) Mosby, ELSEVIER.
- Mas, A., Soares, J. M., Martines-Gonmariz, F., Pollarés, F.J., Berrabé, A., Seva, J.I., (2008). *Actinomicosis Maxilar con Obstrucción de Cavidad Nasal en un Toro de Lide*. *An. Vet. (Murciana)* 24:103-108.
- Meyer R., Carminati, R., Cerqueira, R.B., Vale, V., Viegas, S., Martinez, T. et al. (2002). *Evaluation the goats humoral immune response induced by the Corynebacterium Pseudotuberculosis lyophilized live vaccine*. Salvador: R. CI. Méd. Biol., v.1, n.1,42-48.
- Motta, R.G., Cremasco, A.C.M., Ribeiro, M.G. (2010). Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. *Vet. e Zootec.* 17(2), 200-213.
- Nicolas, J.V. (2007) *Actinomycosis of the Mandible, Mimicking a Malignancy in a Horse: Case Report*. *Can. Ver. J.*: 48: 1261-1263.

- Nolte, O.; Morscher, J.; Weiss, H. E.; Sonntag, H. G., (2001) *Autovaccination of dairy cows to treat post partum metritis caused by Actinomyces pyogenes*. Vaccine. Kidlington: Elsevier, v.19, pp. 3146-3153.
- Oliveira, M., Barroco, C., Mottola, C., Santos, R., Lemsaddek, A., Tavares, L., et al. (2014). *First Report of Corynebacterium Pseudotuberculosis from Caseous Lymphadenitis Lesions in Black Alentejano Pig (Sus Scrofa Domesticus)*, BMC Veterinary Research, 10:218.
- Pan American Health Organization (PAHO) (2001). *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, Bacterioses and Mycoses*, (3<sup>a</sup> ed. volume 1, pp. 3-5).
- Pereira, W.A.B., Nogueira, G.M., Paro, P.H.Z., Espinoza, M.F., Leite A.D. (2010). Linfadenite Ulcerativa em um Touro Nerone: Relato de caso, *Rev. Cient. elect. de Med. Vet.*, ISSN:1679-7353, n.14.
- Radostits, O.M., Gay, C. C, Blood, D.C., Hinchcliff, W.K., (2002). *Clinica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Caprinos e Equinos*, (9th ed. pp. 653-655; 841-843) Guanabara Koogan LTDA.
- Rocha, B, LMV, (2011), *Corynebacterium Pseudotuberculosis em bovinos de leite no Estado da Califórnia, EUA*. Veterinary Medicine, vol. 13, nº 78, pp 49-54.
- Ruiz, I., Jerónimo, R., Carretera, V., Frias, M., Teresa, M., (2007). *Linfadenitis Caseosa I: Aspectos Historicos, etiológicos y clínicos*. RECVET, Vol. II, N.º 8, pp. 1-22.
- Sanford, K., Brogden, K. A., McClelland, L. A., Kozub, G. C., Audibert, F. (1998). The Incidence of Caseous Lymphadenitis in Alberta Sheep and Assessment of Impact by Vaccination with Commercial and Experimental Vaccines. *Can J. Vet Res.*62, pp38-43.
- Sherman H.G.(1916). *Vaccine Therapy in General Practice*, G.H. Sherman, M.D. Detroit, Micch, (3.<sup>a</sup> ed, 58-65) Acedido em 2 de dezembro de 2015, em: <https://books.google.pt/books?id=oXAIawAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=google+books+free+autogenous+vaccine&hl=ptPT&sa=X&ved=0ahUKEwjN5MC4hanJAhUKPxoKHW6kBHIQ6AEINTAE#v=onepage&q=google%20books%20free%20autogenous%20vaccine&f=false>.
- Soerensen, B., Marullui, B.B., Kathia (1999) Manual de Saúde Pública. *Arte e Ciência*, pp. 375.
- Sood, N.K., Sandhu, B.S., Gupta, K., Narang, D., Vasudeva, K., Singh, N.D. (2012). Mesenteric caseous lymphadenitis in a cow calf caused by Corynebacterium pseudotuberculosis: a case report. *Veterinari Medicina*, 57, 371-375.



- Sturion D.J., Ferreira C. Y. M. R., Sturion T.T., Souza F. B., Moya- Araujo C.F., (2015). *Actinomicose em Bovino- relato de caso*, São Paulo, Ciência Animal 25 (2):03-06.  
Acedido julho 14, 2016, em [www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo01\\_2015\\_2.pdf](http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo01_2015_2.pdf).
- Tessele, B., Martins, T.B., Vielmo, A., Barros, C.S.L. (2014) Lesões Granulomatosas Encontradas em Bovinos para Consumo. *Pesq. Vet*, 34(8): 763-769.
- Tessele, B., Vielmo, A., Hammerschmitt, M., Barros, C.S.L. (2014) Actinomicose Atípica em Bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 34(7): 663-666.
- Thrusfield M., Veterinary Epidemiology, Bbutterworth- Heinemann LTD. 1986.
- Tizard R.I. (2014). *Imunologia Veterinária*, (9.<sup>a</sup> Ed. pp: 278, 279), ELSEVIER Editora LDA.  
Acedido fevereiro 2, 2016 em <https://books.google.pt/books?id=4zgcBgAAQBAJ&pg=PA272&lpg=PA272&dq=imunologia+VETERINARIA,+REA%C3%87%C3%95ES+VACINAIS+LOCAIS&source=bl&ots=5BoHRMrnj-&sig=hyL0MYfBMNvFwDuQ5QAPN6MT24o&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwjJgKSSj9nKAhVBnRoKHcdYBoI4ChDoAQgsMAI#v=onepage&q=imunologia%20VETERINARIA%2C%20REA%C3%87%C3%95ES%20VACINAIS%20LOCAIS&f=false>.
- Turk, J.L. (1994). Almroth Wright-phagocytosis and opsonization. *Journal of the Royal Society of Medicine* 87: 576-577.
- White R. J., (2007) *Autogenous vaccine useful tool*, *Nutricion and Health*; Beef, freedstuffs, Fev. 19: 13.
- Wright, A., (1903) A lecture on therapeutic inoculations of bacterial vaccines. *The British Medical Journal Maio*: 1069-1074.
- Wright, A., (1910) *Introductory adress on vaccine therapy: its administration, value and limitations*. The Lancet Setembro: 863-874.
- Yeruham, I., Elad, D., Friedman, S. E., Perl, S. (2003). *Corynebacterium Pseudotuberculosis Infection in Israel Dairy Cattle*. *Epidemiol. Infect.* (131, 947-955) Cambridge University Press.

Legislação consultada:

Decreto-Lei n.º 148/2008, Diário da República, 1.ª série – n.º 145, 29 de julho de 2008.

Diretiva 2004/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de março de 2004. In: *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

# **Anexos**

**Anexo I – Resultados da primeira análise microbiológica  
solicitada, para pesquisa de *Actinobacillus lingnieresii***



<b>Resultado da Análise</b>
-----------------------------

**To:** Dra. Maria João Salgueiro

**From:** Sandra Fernandes

**Fax:**

**Pages:** 2

**Phone:** 918175638

**Date:** 4/12/2014

Junto segue resultado de análise.

**Resultado da Análise**

**Identificação da análise**

Nº da análise: 371/14  
Data de entrega: 23/11/2014

**Identificação do material**

Material  
analisado: Zaragatoas; Tecido e Sangue  
Produtor: Duarte Cabaço  
Veterinário: Dra. Maria João Salgueiro  
Animal: Bovinos

**Testes efectuados**

Testes bacteriológicos.

**Resultado**

Não foram isolados estirpes de *Actinobacillus lignieresii*.

Data: 4/12/2014

Responsável

Sandra Fernandes

## **Anexo II – Resultados do teste de sensibilidade aos antibióticos referentes à amostra enviada**

Teste de Sensibilidade aos Antibióticos

**To:** Dra. Maria João Salgueiro

**From:** Sandra Fernandes

**Fax:**

**Pages:** 1

**Phone:** 918175638

**Date:** 23/11/2014

Análise n.º: 371/14

Amostra: Sangue; Zaragatoas

Animais: Bovinos

Proprietário: Duarte Cabaço

Antibiograma geral

Meio de Cultura: Tryptic Agar

Temperatura de incubação: 37 °C

Antibiótico	Reacção
Amoxicilina/ácido clavulânico	-
Trimetoprim Sulfametoxazol	-
Ofloxacina	++
Oxitetraciclina	++
Cloxacilina	-
Penicilina	-
Enrofloxacina	++

Antibiótico	Reacção
Ampicilina	-
Ácido Nalidixico	-
Gentamicina	+
Tetraciclina	++
Eritromicina	-
Oxacilina	-
Streptomicina	++

Legenda: Resistente (-); pouco sensível (+), sensível (++), muito sensível (+++)

Data: 3/12/2014

Responsável Sandra Fernandes

**Anexo III – Resultados da segunda análise microbiológica  
solicitada, para nova pesquisa do agente etiológico**





## BOLETIM DE ANÁLISE

Para: Dr. Luís Fragoso

Telefone: 918114119

E-mail: luis.a.fragoso@gmail.com

Enviado a: 01/04/2015

### Identificação da análise

Nº da análise: 110/15

Data de receção: 25/03/2015

Observações referentes ao material rececionado:

**Identificação do material**

Material analisado:	Material purulento ensanguentado
Produtor:	Sr. Duarte Cabaço
Veterinário:	Dr. Luís Fragoso
Animal:	

**Testes efetuados**

Análise Microbiológica
------------------------

**Resultado**

<i>Actinomyces bovis; Corynebacterium pseudotuberculosis.</i>
---

Responsável pela análise: Sara Cabaço

Data: 01/04/2015